



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

C B S

**“FISIOLOGÍA DE *Bacillus sphaericus* Y  
SU INTERACCIÓN CON *Methanosarcina mazei*  
EN LA DEGRADACIÓN DE ACETAMIDA”**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**P R E S E N T A**  
**M. en B. FLORINA RAMÍREZ VIVES**



**México, D.F. enero del 2000**

225704

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio número PFP-200-93.**

Marina  
17/8/02

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó**

**M. en B. FLORINA RAMÍREZ VIVES**

**El día 28 de enero del año 2000**

**Comité Tutorial:**

**Tutor: Dr. Ernesto Favela Torres**

**Asesor: Dr. Francisco Cruz Sosa**

**Asesor: Dr. Jean Pierre Guyot**

**Sinodal: Dr. Elias Razo Flores**

**Sinodal: Dr. Hervé Macarie**

**Sinodal: Dr. Rubén Román Ramos**

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

<p>DENOMINACION DE LA TESIS</p> <p>FISIOLOGIA DE <i>Bacillus sphaericus</i> Y SU INTERACCION CON <i>Methanosarcina mazei</i> EN LA DEGRADACION DE ACETAMIDA</p>	<p>En México, D.F. se presentaron a las 11:00 horas del día 28 del mes de ENERO del año 2000 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Comité del Posgrado.</p> <p>DR. ERNESTO FAVELA TORRES; DR. FRANCISCO CRUZ SOSA; DR. HERVE MACARIE DR. RUBEN ROMAN RAMOS Y DR. ELIAS RAZO FLORES</p> <p>bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Disertación Pública para la</p>	
 <p>Doctora en: CIENCIAS BIOLOGICAS</p> <p>de FLORINA RAMIREZ VIVES</p> <p>quien presentó una tesis producto de una investigación original cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Comité resolvieron:</p> <p><i>Aprobada</i></p> <p>Acto continuo, el Presidente del Comité comunicó a la interesada el resultado y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.</p>	<p>obtenición del Grado de</p>	
<p>REVISO</p> <p><i>[Signature]</i> DR. ANTONIO AGUILAR AGUILAR DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES</p>		
<p>VISTO BUENO</p> <p><i>[Signature]</i> DR. JOSE LUIS ARREDONDO FIGUEROA DIRECTOR DE DIVISION</p>	<p>PRESIDENTE</p> <p><i>[Signature]</i> DR. ERNESTO FAVELA TORRES</p>	<p>SECRETARIO</p> <p><i>[Signature]</i> DR. ELIAS RAZO FLORES</p>
<p>VOCAL</p> <p><i>[Signature]</i> DR. FRANCISCO CRUZ SOSA</p>	<p>VOCAL</p> <p><i>[Signature]</i> DR. HERVE MACARIE</p>	<p>VOCAL</p> <p><i>[Signature]</i> DR. RUBEN ROMAN RAMOS</p>

# AGRADECIMIENTOS

---

## **Mis más sinceros agradecimientos:**

A mi padre Ignacio Ramírez, por enseñarme a ser fuerte y perseverante en los momentos difíciles.

A mi hija Adriana Velasco y a mi compañero Juan Carlos Peña a quienes amo y dedico esta tesis, por su apoyo y paciencia para permitirme en muchas ocasiones ausentarme largas horas de ellos.

A Oscar Monroy Hermosillo, por motivarme primero a continuar con el doctorado y por todo el apoyo incondicional que he recibido de él, especialmente durante todo el desarrollo de mi tesis, por orientarme y dirigirme.

A mi comité Tutorial: Dr. Ernesto Favela Torres, Dr. Jean Pierre Guyot y Dr. Francisco Cruz, quienes me ayudaron a darle forma a la tesis mediante sus revisiones y discusiones periódicas.

Al Dr. Hervé Macarie y al Dr. Elias Razo Flores por haber aceptado formar parte de mi jurado y por todos los comentarios que me hicieron llegar para mejorar este documento.

Al Laboratorio de Microbiología Anaerobia de Marsella y al Laboratorio de Biotecnología en Montpellier, Francia, del Instituto Francés de Investigación para el Desarrollo (IRD), por permitirme realizar una parte de esta investigación en sus instalaciones, especialmente a los Doctores Bernard Ollivier y Jean Pierre Guyot por todo su apoyo y asesoría.

A mis alumnos: Zenia Gutiérrez, Juan Ramón Ramos, Margarita Morales, Alejandra Meza, Norma Angélica Sánchez, Edgar Cruz, Raúl González, Itzel Meza y Oscar Ornelas, quienes me ayudaron en la parte experimental de esta tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Mónica Meráz, Margarita Salazar, Carmen Fajardo, Hervé Macarie, Henry Ferrer y Alejandro Olmos, con quienes he compartido horas de trabajo y por su constante apoyo profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para mis estudios de doctorado.

Al Dr. Henry Poupon, representante en México del IRD, por todas las facilidades brindadas.

# RESUMEN

---

La acetamida es un compuesto tóxico muy utilizado en la industria de lacas, cosméticos, textiles y farmacéutica. Es utilizada en diversas aplicaciones como estabilizador de peróxidos y como desechos de varios procesos químicos. Es un producto formado de la degradación biológica del acetonitrilo.

Estudios previos han demostrado que la metanogénesis a partir de la acetamida en lodos anaerobios se lleva a cabo en dos etapas: la acetamida es hidrolizada a acetato y amonio por una bacteria aerobia estricta del género *Bacillus* y el acetato formado es utilizado por *Bacillus* como fuente de carbono o convertido a metano por bacterias metanógenas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar taxonómica, fisiológica y metabólicamente una cepa de *B. sphaericus* aislada de lodos de un reactor UASB y su participación conjunta con una bacteria metanógena (*Methanosarcina mazei*) en la degradación de acetamida hasta metano en presencia de oxígeno.

Para todos los estudios realizados se usó el medio de cultivo de Balch, con acetamida como fuente de carbono, extracto de levadura y peptona de caseína.

El estudio fisiológico, taxonómico y metabólico de la cepa de *B. sphaericus* confirman que se trata de una bacteria aerobia estricta, capaz de crecer en bicultivo con bacterias metanógenas debido a que presenta condiciones fisiológicas de cultivo muy similares a estas bacterias, excepto por su necesidad de oxígeno.

Se llevó a cabo también una cinética de degradación de acetamida por *B. sphaericus* en un reactor continuo con acumulación de biomasa. El oxígeno se mantuvo disuelto en la alimentación a razón de 6.4 mg/L, con el fin de mantener las condiciones de los reactores anaerobios. Para la determinación de los parámetros cinéticos ( $Y$ ,  $\mu_{\max}$  y  $K_s$ ) se siguió un modelo de reacciones en serie (acetamida  $\rightarrow$  acetato  $\rightarrow$  biomasa). Los resultados muestran que *B. sphaericus* puede hidrolizar acetamida en una reacción de orden  $1\frac{1}{2}$  global, con un valor de la constante de reacción  $k_1 = 0.103 \text{ (L/g)}^{0.5} \cdot \text{h}^{-1}$ . Los parámetros de crecimiento con acetato como fuente de carbono, bajo estas condiciones, fueron  $\mu_{\max} = 0.1 \text{ d}^{-1}$ ,  $K_s = 37 \text{ mg/L}$ ,  $Y = 0.484 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{Ac}}$ .

Posteriormente se estudió un bicultivo de *B. sphaericus* y *Methanosarcina* en reactores intermitentes. Los resultados muestran que la acetamida es hidrolizada a las 24 horas, mientras que la producción de metano presenta una fase de retardo de 3 o más días, sugiriendo un efecto tóxico del oxígeno en *Methanosarcina*. En el reactor en continuo con oxígeno el bicultivo presenta una hidrólisis de la acetamida del 40% y una remoción del 13 al 30%. La producción de metano no fue significativa, sugiriendo que el acetato fue consumido rápidamente por *B. sphaericus*, quedando muy poco acetato para la metanogénesis.

# ABSTRACT

---

Acetamide is a widely used toxic chemical compound in lacquers, cosmetics, explosive, textile and pharmaceutical industries. Miscellaneous applications include its use as a stabilizer in peroxides and as raw material in organic synthesis. It is a product of the biological degradation of acetonitrile.

A previous study, showed that the methanogenesis of acetamide occurs through a two-step reaction in methanogenic sludges. Acetamide is hydrolyzed to acetate and ammonia by strict aerobic bacterium of genus *Bacillus* and then acetate is used by *Bacillus* as carbon source or converted to methane by methanogens.

Recently some work has focused on the possibility of strict or facultative aerobes and strict anaerobes co-existing in an unique environment.

The objective of this work was to study taxonomically, physiologically and metabolically *B. sphaericus* isolated of a UASB reactor sludge and its combined participation with a methanogenic bacteria (*Methanosarcina mazei*) in the acetamide degradation until methane in presence of oxygen.

All the studies were carried out in mineral medium added with acetamide as carbon source and with yeast extract and casein peptone.

The physiologic, taxonomic and metabolic studies of *B. sphaericus* confirm that is a strict aerobic bacteria, able to grow in coculture with methanogens, due to the very similar cultivation physiological conditions of cultivation both require, except for their oxygen necessity.

It was also carried out the kinetics of acetamide degradation by *B. sphaericus* in a continuous reactor with biomass accumulation. The oxygen supplied was dissolved in the feed (6.4 mg/L) to resemble the conditions of an anaerobic wastewater treatment reactor. A reaction in series model (acetamida → acetate → biomass) was used to find the kinetics parameters ( $Y$ ,  $\mu_{\max}$  and  $K_s$ ). Results show that *B. sphaericus* can hydrolyze acetamide in 1.5 order reaction with  $k_1 = 0.103 \text{ (g/L)}^{0.5} \cdot \text{h}^{-1}$ . The growth parameters found on acetate as carbon source, were:  $\mu_{\max} = 0.1 \text{ d}^{-1}$ ,  $K_s = 37 \text{ mg/L}$ ,  $Y = 0.484 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{Ac}}$ .

The coculture of *B. sphaericus* and *Methanosarcina* was carried out in batch reactors. The acetamide was hydrolyzed in 24 h, while methane production lagged for 3 or more days, suggesting a toxic effect of oxygen on *Methanosarcina*. In the continuous reactor with oxygen available this coculture mineralized 40% of acetamide with 13 to 30% COD removal. Methane production was negligible suggesting that the acetate was consumed quickly by *B. sphaericus*, remaining only low acetate concentrations for *Methanosarcina mazei*.

# ÍNDICE

---

ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xvii
GLOSARIO	xviii
ABREVIATURAS	xix
VARIABLES Y PARÁMETROS	xx
PANORAMA DE LA TESIS	xxi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 ANTECEDENTES	2
1.2 DIGESTIÓN ANAEROBIA	4
1.2.1 Acidogénesis	5
1.2.2 Acetogénesis	6
1.2.3 Metanogénesis	8
1.3 EL PAPEL DEL OXÍGENO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA	18
1.4 EL GÉNERO <i>Bacillus</i>	21
1.4.1 Morfología	27
1.4.2 Composición de la pared celular	28
1.4.3 Otras estructuras	29
1.4.4 Característica colonial	30
1.4.5 Ciclo de vida	31

1.4.6 Nutrición y condiciones de crecimiento	33
1.4.7 Genética	34
1.4.8 Sensibilidad a los antibióticos	36
1.4.9 Patogenicidad	37
1.4.10 Ecología	38
1.5 REACTORES DE LECHO DE LODOS DE FLUJO ASCENDENTE (UASB)	39
1.6 JUSTIFICACIÓN	42
1.7 OBJETIVOS	43
1.8 HIPÓTESIS	44
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
2.1 MICROORGANISMOS	46
2.1.1 Bacteria aerobia	46
2.1.2 Bacterias metanogénicas	46
2.2 MEDIO DE CULTIVO	46
2.3 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS	47
2.4 ESTUDIO TAXONÓMICO Y FISIOLÓGICO DE <i>Bacillus sphaericus</i>	48
2.4.1 Efecto de la temperatura	49
2.4.2 Efecto de la concentración de extracto de levadura y peptona	49
2.4.3 Tolerancia a la sal	49
2.4.4 Influencia del oxígeno	50
2.4.5 Efecto del pH	50
2.4.6 Morfología	51
2.4.7 Termoestabilidad de las endosporas	51
2.4.8 Catalasa	51
2.4.9 Citocromo oxidasa	52
2.4.10 Crecimiento a partir de diferentes sustratos	53
2.4.11 Pruebas bioquímicas por galerías API	54
2.4.12 Filogenética	55
2.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS ( $Y$ , $\mu_{\max}$ y $K_s$ ) DE <i>M. mazei</i>	56
2.6 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETAMIDA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO POR <i>M. mazei</i>	57

2.7 BICULTIVOS EN LOTE	57
2.8 ANÁLISIS	58
2.8.1 Acetamida	58
2.8.2 Acetato	58
2.8.3 Oxígeno	59
2.8.4 Metano	59
2.8.5 Biomasa	59
2.9 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	59
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	61
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA DE <i>Bacillus sphaericus</i>	62
3.1.1 Efecto de la temperatura	62
3.1.2 Efecto de la concentración de extracto de levadura y peptona	64
3.1.3 Tolerancia a la salinidad	67
3.1.4 Influencia del oxígeno	68
3.1.5 Efecto del pH	70
3.1.6 Morfología	72
3.1.7 Termoestabilidad de las endosporas	74
3.1.8 Catalasa	75
3.1.9 Citocromo-oxidasa	75
3.1.10 Crecimiento a partir de diferentes sustratos	76
3.1.11 Pruebas bioquímicas por galerías API	79
3.1.12 Filogenética	80
3.1.13 Conclusiones	82
3.2 DEGRADACIÓN DE ACETAMIDA POR <i>Bacillus sphaericus</i> EN UN REACTOR CONTINUO CON ACUMULACIÓN DE BIOMASA	82
3.2.1 Introducción	82
3.2.2 Diseño experimental	84
3.2.2.1 Reactor continuo	84
3.2.2.2 Determinación de las constantes cinéticas de <i>B. sphaericus</i>	86
3.2.3 Resultados y discusión	87
3.2.4 Conclusiones	94

3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS “Y, V <sub>max</sub> , K <sub>s</sub> ” DE <i>Methanosarcina mazei</i>	95
3.3.1 Conclusiones	98
3.4 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETAMIDA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO POR <i>M. mazei</i>	98
3.4.1 Conclusiones	99
3.5 DEGRADACIÓN DE ACETAMIDA POR UN BICULTIVO DE <i>Bacillus</i> <i>sphaericus</i> Y <i>Methanosarcina mazei</i>	100
3.5.1 Introducción	100
3.5.2 Diseño experimental	101
3.5.3 Resultados y discusión	103
3.5.3.1 Bicultivos en lote	103
3.5.3.2 Degradación de acetamida por un bicultivo continuo de <i>B.</i> <i>sphaericus</i> y <i>M. mazei</i> en presencia de oxígeno	106
3.5.4 Conclusiones	114
<b>4. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES</b>	117
<b>5. REFERENCIAS</b>	119

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

1.1 Vía de la metanogénesis a partir de acetato	14
3.1 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. a diferentes temperaturas	63
3.2 Influencia de la temperatura en la velocidad específica de crecimiento de <i>Bacillus</i>	64
3.3 Energía de activación ( $\epsilon_a$ ) de <i>Bacillus</i> sp.	64
3.4 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. con diferentes concentraciones de extracto de levadura y peptona	65
3.5 Influencia de la concentración de extracto de levadura y peptona en la velocidad específica de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.	66
3.6 Obtención de $K_s$ y $\mu_{max}$ de <i>Bacillus</i> sp. con extracto de levadura y peptona	66
3.7 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. con diferentes concentraciones de NaCl	67
3.8 Influencia de la concentración de NaCl en la velocidad específica de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.	68
3.9 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. con diferentes concentraciones de oxígeno	69
3.10 Influencia de la concentración de oxígeno en la velocidad específica de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.	69
3.11 Linearización de los datos obtenidos de la Figura 3.10	70
3.12 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. a diferentes pH	71
3.13 Influencia del pH en la velocidad específica de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.	72
3.14 Morfología microscópica las células de <i>Bacillus</i> sp.	72
3.15 Microfotografía electrónica de los flagelos de <i>Bacillus</i> sp.	73
3.16 Microfotografía electrónica de <i>Bacillus</i> sp. formando cadenas	73

3.17 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. a diferentes tratamientos térmicos	75
3.18 Reactor continuo con acumulación de biomasa	85
3.19a Cultivo continuo de <i>B. sphaericus</i> en un reactor RCTB expuesto a diferentes cargas orgánicas volumétricas	88
3.19b Acumulación de biomasa de <i>B. sphaericus</i>	88
3.20 Obtención de la constante de reacción a partir de la hidrólisis de acetamida	90
3.21 Obtención de las constantes $\mu_{\max}$ y $K_s$ en cultivo continuo	90
3.22 Eficiencia de la hidrólisis de acetamida como una función de la carga orgánica volumétrica	91
3.23 Eficiencia de hidrólisis de acetamida como una función de carga orgánica específica	92
3.24 Tasa específica de hidrólisis de acetamida como una función de la concentración	92
3.25 Influencia del oxígeno en la hidrólisis de acetamida	93
3.26 Tasa específica de consumo de acetato como una función de la carga de oxígeno	94
3.27 Producción de metano por <i>M. mazei</i> con diferentes concentraciones de acetato	96
3.28 Influencia de la concentración de acetato en la velocidad de producción de metano	96
3.29 Obtención de $K_s$ y $\mu_{\max}$ de <i>M. mazei</i> a partir de acetato	97
3.30 Producción de metano por <i>M. mazei</i> en presencia de acetamida	99
3.31 Producción de metano a partir de un bicultivo intermitente de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i>	104
3.32 Producción de metano a partir de un bicultivo intermitente de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. barkeri</i>	105
3.33 Cultivo continuo de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i> en presencia de oxígeno	107
3.34 Producción de metano por el bicultivo de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i> en continuo	108
3.35 Balance de metano teórico y experimental del bicultivo en continuo	109
3.36 Eficiencia de hidrólisis de la acetamida como una función de la carga orgánica volumétrica	111
3.37 Velocidad de hidrólisis como una función de la concentración de acetamida	112
3.38 Eficiencia de remoción de acetato como una función de la carga de acetamida	112
3.39 Microfotografía electrónica del lecho formado de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i>	113

# ÍNDICE DE TABLAS

---

1.1 Comparación fisiológica de <i>Methanosarcina</i> spp. y <i>Methanosaeta</i> spp.	13
1.2 Características diferenciales de las especies del género <i>Bacillus</i>	23
2.1 Composición del medio de cultivo	47
3.1 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. en diferentes compuestos	77
3.2 Crecimiento de <i>Bacillus</i> sp. con diferentes amidas	79
3.3 Características más importantes de la cepa de <i>Bacillus</i> sp.	81
3.4 Ecuaciones cinéticas para la degradación de acetamida, producción de acetato y producción de biomasa de <i>B. sphaericus</i>	83
3.5 Balances de materia en el cultivo continuo de <i>B. sphaericus</i>	83
3.6 Diseño experimental para el crecimiento de <i>B. sphaericus</i> en cultivo continuo	86
3.7 Resultados de la hidrólisis de acetamida por <i>B. sphaericus</i> en cultivo continuo	89
3.8 Constantes cinéticas de <i>Methanosarcina</i> spp.	97
3.9 Velocidades de producción de metano por <i>M. mazei</i> en presencia de acetamida	99
3.10 Diseño experimental para la degradación de acetamida por el bicultivo de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i>	103
3.11 Degradación de acetamida por <i>B. sphaericus</i> y <i>Methanosarcina</i> en lote	105
3.12 Constantes cinéticas de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i>	109
3.13 Resultados de la degradación de acetamida por el bicultivos de <i>B. sphaericus</i> y <i>M. mazei</i> en continuo	110
3.14 Crecimiento de <i>B. sphaericus</i> y actividad metanogénica de <i>M. mazei</i> en el lecho del reactor continuo	114

# GLOSARIO

---

- Aerobio** En presencia de oxígeno, es decir, se utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones.
- Anaerobio** En ausencia de aire o sea sin oxígeno molecular como aceptor final de electrones.
- Digestión anaerobia** Término dado al proceso mediante el cual diversos grupos de microorganismos hidrolizan o degradan sustancias orgánicas hasta formas más sencillas por la acción de diferentes enzimas en ausencia de oxígeno molecular para dar como productos finales metano y bióxido de carbono.
- Metanógena** Bacterias anaerobias estrictas productoras de metano
- Recalcitrante** Compuesto muy estable que debido a su naturaleza química no puede ser degradado fácilmente y generalmente es tóxico.
- Xenobiótico** Compuesto que solamente puede ser obtenido por síntesis química y no se encuentra en forma libre en la naturaleza.

# ABREVIATURAS

---

<b>Ac</b>	Acido acético
<b>AGV</b>	Acidos grasos volátiles
<b>Am</b>	Acetamida
<b>BMH</b>	Bacterias metanogénicas hidrogenotróficas
<b>BSR</b>	Bacterias sulfato reductoras
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>OD</b>	Oxígeno disuelto
<b>OHPA</b>	Bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno
<b>UASB</b>	Reactor anaerobio de lecho de lodos de flujo ascendente por sus siglas en inglés " <i>upflow anaerobic sludge blanket</i> "
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>URBA</b>	Reactor anaerobio con retención de biomasa de flujo ascendente

# VARIABLES Y PARÁMETROS

---

$\mu_{\max}$	Velocidad específica de crecimiento máxima ( $d^{-1}$ )
$B_v$	Velocidad de carga orgánica volumétrica ( $g \cdot L^{-1} d^{-1}$ )
$B_v$	Carga volumétrica ( $mg_{Am}/L \cdot d$ )
$B_x$	Velocidad de carga orgánica específica ( $g_{Am} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot d^{-1}$ )
$D$	Tasa de dilución ( $d^{-1}$ )
$K_s$	Constante de afinidad ( $g \cdot L^{-1}$ )
$pH$	Concentración de iones $H^+$ ( $-\log [H^+]$ )
$t_g$	Tiempo de generación (d)
$TRH$	Tiempo de retención hidráulica (d)
$V$	Volumen (L)
$V_{\max}$	Velocidad máxima de formación ( $mM/L \cdot h$ )
$Y$	Coefficiente de rendimiento celular ( $g_{cel}/g_{Ac}$ )

# PANORAMA DE LA TESIS

---

En el capítulo 1 de esta tesis se hace una revisión de la bioquímica y microbiología de la digestión anaerobia, una revisión de las características del género *Bacillus* y se analizan posibles nichos ecológicos en donde podrían interactuar las bacterias aerobias y las anaerobias. Se describen también las características del reactor UASB como un nicho para la operación del bicultivo.

En el capítulo 2 se hace una revisión de los materiales y métodos fundamentales en el estudio de la microbiología anaerobia y en la caracterización de *Bacillus*, poniendo especial énfasis en la determinación de la acetamida y en la de acetato para la operación de los reactores en continuo.

En la sección 3.1, se identifica y caracteriza la especie de *Bacillus* aislada del reactor UASB y responsable de la hidrólisis de acetamida. Se pone principal atención en la caracterización fisiológica para identificar los nichos de interacción con bacterias anaerobias. Se concluye que la especie es *B. sphaericus* y de acuerdo a sus características puede habitar en el mismo nicho que las bacterias metanogénicas,

con la única excepción que requiere el oxígeno para su crecimiento, que puede ser a su vez inhibitorio para las bacterias metanogénicas.

En la sección 3.2, se plantea un modelo de degradación de la acetamida y acetato por *B. sphaericus* en condiciones controladas de oxígeno y se estudian las condiciones que permiten este hecho. Se concluye que *B. sphaericus* puede hidrolizar acetamida y usar el acetato para su crecimiento. Con 6.4 mg de oxígeno disuelto/L en la alimentación, *B. sphaericus* tiene una constante de afinidad ( $K_s$ ) para el acetato mucho mayor que la que presentan las bacterias metanógenas, una velocidad específica de crecimiento máximo de una orden de magnitud menor que estas bacterias y un rendimiento celular mayor, por lo que se necesita operar el bicultivo con una alta concentración de bacterias metanógenas.

En la sección 3.3, se estudian las condiciones de degradación de la acetamida y del acetato por un bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei*. Se concluye que el bicultivo no puede metanizar de manera eficiente la acetamida ya que el acetato es el sustrato competido y su utilización se encuentra desplazada principalmente hacia el crecimiento de *B. sphaericus*.

# INTRODUCCIÓN

---

Dado que los sistemas convencionales de tratamiento biológico de aguas residuales no eliminan completamente los compuestos xenobióticos y recalcitrantes encontrados en las aguas residuales industriales, es necesario estudiar procesos alternos que ayuden a lograr una mejor remoción de estos compuestos. La eliminación de muchos de ellos solo es posible utilizando sistemas de tratamiento combinados, anaerobio-aerobio, (Macarie y Guiot, 1995), lo que ocasiona elevar los costos de tratamiento. Con la finalidad de lograr la oxidación total de estos compuestos, una de las alternativas que se propone es la coexistencia de poblaciones microbianas aerobias y anaerobias en el mismo sistema de tratamiento. Los microorganismos capaces de metabolizar los compuestos xenobióticos y recalcitrantes son diversos e incluyen bacterias y hongos. Algunos de estos compuestos sirven como fuente de carbono y energía, y pueden ser oxidados completamente hasta  $\text{CO}_2$ ; sin embargo, otros son altamente recalcitrantes y solo

pueden ser degradados parcial o totalmente en presencia de algún material orgánico adicional como fuente energética primaria (cometabolismo) o por el cambio en ciertas condiciones de cultivo. Por ejemplo, ciertos hidrocarburos clorados solamente pueden ser desclorados anaeróbicamente y sus intermediarios son metabolizados después por bacterias aerobias.

Algunos de los compuestos xenobióticos más ampliamente distribuidos en la naturaleza son los plaguicidas (herbicidas, insecticidas y fungicidas). Muchos de estos compuestos son derivados de la acetamida, tal es el caso del herbicida Alachlor (cloroacetamida), que ha sido utilizado durante muchos años para el control de malezas (Muller y Buser, 1995) y de insectos (Moretti, 1978).

## **1.1 ANTECEDENTES**

La acetamida ( $\text{CH}_3\text{CONH}_2$ ) es un compuesto que en virtud de sus características es utilizado como solvente en muchos procesos industriales (crioscopía, soldadura e industria textil entre otras). Es utilizado como antiácido en lacas, como estabilizador de peróxidos ( $\text{R-O-O-R}$ ) y como materia prima en síntesis orgánica. También es usado en la preparación de plásticos (Moretti, 1978). Es un producto formado de la degradación biológica de nitrilos ( $\text{R-CN}$ ), tales como el acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{-CN}$ ) (DiGeronimo y Antoine 1976). La administración de acetamida en ratas en forma oral forma tumores malignos en el hígado, causa desnaturalización de las proteínas macromoleculares e inhibe el desarrollo de frijol, tomate y pepinos (Moretti, 1978).

Muy poca información se ha reportado sobre el daño ecológico que pueden ocasionar las amidas ( $R-CO-NH_2$ ). Las descargas directas de aguas residuales que contienen estos compuestos pueden causar daños severos a la salud, ya que algunos de ellos son altamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos (Mohamed *et al.*, 1989).

Poca es la información sobre los microorganismos capaces de metabolizar las amidas y sus derivados. Los microorganismos aislados o estudiados en la degradación de estos compuestos pertenecen principalmente a los géneros *Pseudomonas* (Robinson y Hook, 1964; Yamada *et al.*, 1979), *Nocardia* (DiGeronimo y Antoine, 1976), *Rhodococcus* y *Bacillus* (Kubo *et al.*, 1994).

Guyot *et al.* (1994; 1995) demostraron que la degradación de la acetamida en reactores anaerobios se lleva a cabo a través de dos pasos: la hidrólisis en acetato y amonio y la posterior metanización del acetato independientemente del origen del inóculo. Sin embargo, se encontró que la acetamida por arriba de  $3 \text{ kgDQO/m}^3\cdot\text{d}$  inhibe la metanogénesis, pues al aumentar la velocidad de carga se acumula tanto la acetamida como el acetato.

Ramírez (1993) aisló del lodo de un reactor UASB a los microorganismos responsables de la degradación de la acetamida. Fueron identificados parcialmente y clasificados como género *Bacillus* a los responsables de la hidrólisis de acetamida y *Methanosarcina* a los que transforman el acetato a metano. La cepa aislada de *Bacillus* es una bacteria aerobia estricta que durante su aislamiento y caracterización parcial no fue posible cultivarla en condiciones de microaerofilia ni anaerobias. Las

especies del género *Bacillus* presentan una gran diversidad en cuanto a su crecimiento, la mayoría de las cepas reportadas pueden ser aeróbicas estrictas, microaerofílicas o facultativas. Debido a la presencia de endosporas, este género presenta una gran resistencia a los cambios en el medio ambiente, algunas especies pueden sobrevivir después de muchos años.

Las bacterias metanogénicas toman sus requerimientos energéticos y producen biomasa de la materia orgánica en descomposición a través de una vía anaerobia estricta, basando su bioquímica en muy pocos sustratos. El género *Methanosarcina* es el más versátil de todos ya que utiliza una amplia variedad de sustratos. Es uno de los género más encontrados en los digestores anaerobios junto con *Methanosaeta*.

Varios autores han reportado que existe un sinergismo entre microorganismos aerobios estrictos y anaerobios (Gerritse y Gottschal, 1992; Guyot y Fajardo, 1993; Kato *et al.*, 1993; Guyot *et al.*, 1994, 1995). Los estudios reportados sobre este tema han sido enfocados principalmente al aislamiento y cuantificación de las bacterias aerobias estrictas y a los resultados del proceso, pero muy poco ha sido el interés por estudiar el tipo de interacción que pueda existir entre estos dos tipos de consorcios microbianos.

## **1.2 DIGESTIÓN ANAEROBIA**

La producción de metano se lleva a cabo mediante un grupo especializado de microorganismos denominado las bacterias metanógenas, que están clasificadas

dentro del reino de las Archeobacterias (Lapent, 1992), las cuales presentan características muy diferentes de las que presentan los procariotes y eucariotes.

La formación de metano proviene de la descomposición de sustratos como la celulosa, almidón, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y numerosas sustancias de otros tipos. Aunque en un principio se pensó que las bacterias metanogénicas degradaban directamente estos compuestos, en la actualidad se sabe que la formación de metano a partir de estos materiales requiere de la participación de otras bacterias. Estas últimas fermentan los diferentes compuestos a acetato, hidrógeno y bióxido de carbono, los cuales son utilizados por las bacterias metanogénicas para producir metano. La metanogénesis se lleva a cabo en las siguientes etapas:

**1.2.1 Acidogénesis:** Es la hidrólisis y fermentación de polímeros biológicos, como proteínas, carbohidratos y lípidos que son transformados a compuestos más simples como ácidos grasos volátiles (AGV), alcoholes y otros ácidos orgánicos. La hidrólisis es llevada a cabo por bacterias con actividades enzimáticas hidrolíticas (proteasas, lipasas y polisacaridasas) (Toerien y Hattingii, 1969), y por bacterias fermentativas de varios géneros y especies. Esta etapa se lleva a cabo a través de varias vías metabólicas (catabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, etc.). Las bacterias que participan en esta etapa pueden ser anaerobias estrictas o facultativas.

**1.2.2 Acetogénesis:** Es la formación de acetato a partir de los productos formados en la primera etapa, tales como AGV, lactato, alcoholes, compuestos aromáticos etc.; éstos son transformados a acetato, hidrógeno y bióxido de carbono por tres grupos diferentes de bacterias:

**1.2.2.1 Bacterias acetógenas obligadas a producir hidrógeno (OHPA).** Son bacterias que tienen la particularidad de inhibirse con el H<sub>2</sub> que producen, por lo que deben permanecer en estrecha relación sintrófica con bacterias consumidoras de H<sub>2</sub>, tales como las bacterias metanógenas hidrogenotrofas (BMH) y cuando hay sulfato en el medio también participan las bacterias sulfato reductoras (BSR). Sin embargo, cuando el medio no contiene sulfato, ciertas BSR son capaces de establecer una relación sintrófica con las BMH de la misma manera que las OHPA. En este proceso las BMH eliminan el hidrógeno producido por las BSR reemplazando al sulfato como aceptor final de electrones y haciendo las reacciones termodinámicamente favorables. Solo un número restringido de especies son capaces de realizar esta transferencia y pertenecen al género *Desulfovibrio*.

Esta relación sintrófica que se establece entre bacterias OHPA y BMH, recibe el nombre de "transferencia de hidrógeno entre especies". Esta transferencia de hidrógeno es sumamente importante para entender los fenómenos de regulación de la digestión anaerobia ya que permite un balance energético favorable. Este fenómeno de transferencia tiene también importancia en la primera etapa, ya que si hay acumulación de hidrógeno en el sistema, las bacterias fermentativas estarían

obligadas a producir gran cantidad de compuestos más reducidos que el acetato, tales como el etanol, lactato, propionato, butirato, etc. causando una inhibición en la producción de metano.

Debido a que tienen tiempos de generación muy largos (161 horas) se han aislado muy pocas bacterias OHPA. El aislamiento de estas bacterias se vuelve muy difícil ya que el hidrógeno que producen es inhibitorio para su crecimiento por lo que al permanecer en bicultivo con una bacteria hidrogenotrofa limita su estudio fisiológico (McInerney *et al.*, 1981; Boone y Bryant, 1980; Roy *et al.* 1986; Stieb y Schink, 1985; Zhao *et al.*, 1990). Se han descrito 5 géneros de bacterias sintróficas que contribuyen en la oxidación de ácidos grasos, benzoato y fructosa, tales como *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophus buswellii* y *Clostridium bryantii* entre otros (Dolfing, 1988).

**1.2.2.2 Bacterias homoacetogénicas.** Estas bacterias fermentativas se caracterizan por la producción exclusiva de acetato. Esta producción de acetato puede hacerse a partir de un sustrato carbonado (azúcares), reduciendo el bióxido de carbono con los electrones formados a partir de la fermentación de este sustrato (grupo 1), o bien a partir de la reducción del bióxido de carbono por el hidrógeno (grupo 2) (Andreesen *et al.*, 1970; Balch *et al.*, 1977). La vía de formación de acetato a partir de bióxido de carbono más hidrógeno no parece ser competitiva con la metanogénesis, ya que en los digestores anaerobios se encuentran alrededor de

cien veces menos bacterias homoacetogénicas del grupo 2 que de bacterias metanogénicas.

Estas bacterias pertenecen a grupos bacterianos muy diversos y tienen las siguientes características (Guyot, 1988):

- 1) Producen tres moles de acetato a partir de la glucosa o fructosa
- 2) No producen hidrógeno molecular
- 3) Requieren CO<sub>2</sub> para su crecimiento
- 4) Incorporan CO<sub>2</sub> al acetato en presencia de carbohidratos

**1.2.3 Metanogénesis:** La producción de metano se lleva a cabo mediante un grupo altamente especializado de microorganismos, las bacterias metanógenas, que son anaerobias obligadas. Algunas de las características de estos microorganismos sugieren que este tipo de bacterias predominaron en la ecología primitiva. Varios de sus hábitats que parecen extremos en términos de las condiciones terrestres actuales, fueron normales en un mundo caluroso de hace más de 3 a 4 millones de años, con atmósferas reducidas y una mezcla de gases como el metano, bióxido de carbono e hidrógeno (Woese y Fox, 1978; Balch *et al.*, 1979).

A pesar de la anaerobiosis obligada y de su metabolismo especializado, los metanógenos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque su distribución es altamente dependiente de su adaptación a varias temperaturas, pH y salinidad (García, 1990). Pueden encontrarse en los pantanos, ciénagas, tracto digestivo de termitas, rumiantes, suelos de arrozales, sedimentos marinos, etc. El

proceso de metanización también ocurre en microambientes que normalmente podrían considerarse aeróbicos, por ejemplo un bosque o terrenos de praderas.

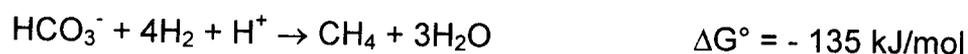
Las bacterias metanogénicas se caracterizan porque toman sus requerimientos energéticos y producen biomasa a través de una vía anaerobia, basando su bioquímica en sustratos tales como: formiato, acetato, metanol, metilaminas, metildisulfuros, 2-propanol, ciclopentanol e hidrógeno más bióxido de carbono (Rouvière y Wolfe, 1988; Widdel, 1986). Controlan mediante su propio metabolismo la velocidad de degradación de los sustratos más complejos ya que ocupan un lugar terminal en la transferencia de electrones. Al mismo tiempo dirigen el flujo de carbono hacia la eliminación de metabolitos tóxicos, mejorando su eficiencia termodinámica.

Debido a su muy antigua divergencia evolutiva, las Arqueobacterias poseen una bioquímica muy característica que se ha mantenido aislada y que no es compartida por ningún otro ser vivo. Las bacterias metanógenas tienen en común la presencia de coenzimas que no se encuentran en otros géneros de bacterias como la coenzima M, el cofactor F<sub>420</sub>, (5-deazaflavina), el cofactor F<sub>430</sub>, etc. (Rouvière y Wolfe, 1988). La función de estas coenzimas será explicada más adelante.

La taxonomía de las bacterias metanogénicas ha sido revisada extensamente con estudios de la secuencia de oligonucléotidos 16 S rRNA (Balch *et al.*, 1979). Las características de las bacterias metanogénicas han sido descritas por Oremlan (1988) y por Balch *et al.* (1979) quienes realizaron un extenso estudio sobre la taxonomía de estas bacterias, incluyendo tres órdenes, siete familias y 68 especies.

Básicamente estas bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos tróficos:

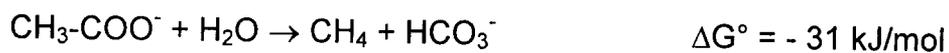
a) **Bacterias hidrogenotrofas:** obtienen su energía de la oxidación del hidrógeno en presencia de bióxido de carbono como aceptor de electrones. La mayoría de las bacterias de este grupo pueden utilizar el formiato pero no pueden utilizar el acetato como fuente de energía aunque algunas lo usan como fuente de carbono. Las ecuaciones de metanogénesis a partir de estos sustratos son:



Las bacterias más utilizadas en estudios bioquímicos y fisiológicos son:

- *Methanobacterium formicicum*
- *Methanospirillum hungatei*
- *Methanobrevibacter* sp.
- *Methanobacterium thermoautotrophicum*

b) **Bacterias acetoclásticas:** Estas bacterias producen metano a partir del grupo metilo del acetato según la siguiente ecuación:



La reducción de dicho grupo a metano es energéticamente favorable (Rivera-Ramírez *et al.*, 1993) y esta reacción es de suma importancia para la formación de metano, dado que el 73% del metano producido viene del acetato (Smith y Mah, 1966).

Las bacterias metanogénicas acetoclásticas a su vez pueden dividirse en dos géneros:

1) Género *Methanosarcina*: Son cocos irregulares de 1 a 1,000  $\mu\text{m}$ , ocurren solos o formando agregados de células. Presentan una baja afinidad por el acetato. Tienen un  $K_m$  para el acetato del orden de 3-5 mM y tiempos de generación que pueden ser de 30 horas o más. Son anaerobias estrictas, con temperatura y pH óptimos de 30-40°C y 6.8 a 7.2, respectivamente. Las concentraciones óptimas de NaCl para su crecimiento son de 0.1-0.5 M (Jetten *et al.*, 1992). El amonio y las metilaminas sirven como fuente de nitrógeno (Holt *et al.*, 1994). El uso del ácido acético por las bacterias de este grupo puede ser inhibido por el hidrógeno y el formiato (Guyot y Ramírez, 1989). Han sido aisladas de sedimentos de agua dulce, sedimentos marinos, rumen y digestores anaerobios.

Además del acetato, *Methanosarcina* puede utilizar metilaminas, metildisulfuros, metanol e hidrógeno (Smith y Mah, 1978). Las especies más representativas son: *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* y *Methanosarcina thermophila*. La biomasa formada se presenta en forma de agregados por lo que recientemente este grupo de metanogénicas ha sido utilizado para estudios de degradación de diferentes compuestos en co-cultivo con bacterias aerobias estrictas (Kato *et al.*, 1993; Kiener y Leisinger, 1983; Fetzer *et al.*, 1993). Se ha demostrado que debido a que la biomasa se presenta como agregados, estas bacterias pueden soportar de mejor manera las condiciones adversas y, en bicultivos con bacterias aerobias, son

éstas las encargadas de utilizar el oxígeno como aceptor de electrones y logran la reducción del medio para que las metanogénicas puedan lograr la oxidación del compuesto hasta CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Gerritse y Gottschal, 1993).

2) Género *Methanosaeta*: Anteriormente, este género era conocido como *Methanothrix* (Zehnder *et al.*, 1980), pero Patel y Sprot en 1990 hicieron el cambio por *Methanosaeta*. Son bacilos que forman largos filamentos fácilmente identificables por observación microscópica. Tienen un K<sub>m</sub> para el acetato entre 0.5 y 1.2 mM y tiempos de generación muy largos (65-70 h) (Jetten *et al.*, 1992). Este género difiere de *Methanosarcina* en que solamente consumen acetato como fuente de carbono y energía. Su rendimiento celular es de 1.4 g células/mol de acetato. No son inhibidas por hidrógeno y formiato. Las especies más representativas de este grupo son *Methanosaeta concilii* y *Methanosaeta thermoacetophila*.

Aunque ambos microorganismos producen metano a partir de acetato, su metabolismo presenta algunas diferencias (Tabla 1.1).

Comparando estas diferencias fisiológicas, se puede ver que el crecimiento de *Methanosaeta* se ve favorecido en concentraciones bajas de acetato, mientras que *Methanosarcina* puede crecer a concentraciones mayores (Jetten *et al.*, 1992).

**Tabla 1.1 Comparación fisiológica de *Methanosarcina* spp. y *Methanosaeta* spp. (Jetten *et al.*, 1992).**

	<i>Methanosarcina</i> spp.	<i>Methanosaeta</i> spp.
<b>Fisiología</b>	Generalista	Especialista
<b>Sustratos</b>	Hidrógeno, metanol, metilaminas, metildisulfuros, acetato	Acetato
$\mu_{\max}$ (d <sup>-1</sup> )	0.3	0.1
<b>Tiempo de generación (días)</b>	0.5-2	1-12
<b>Rendimiento (g<sub>cel</sub>/mol Ac)</b>	2.1	1.4
<b>K<sub>s</sub> (mM)</b>	3 – 5	0.5 - 1.2
<b>Concentraciones de acetato mínimas (μM)</b>	200-1180	7-70

### Bioquímica de la metanogénesis acetoclástica

En la Figura 1.1 se muestra la vía metabólica de la formación de metano a partir del acetato. La formación de metano a partir del acetato incluye un desdoblamiento de la molécula, con la formación de metano a partir del grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) y de CO<sub>2</sub> a partir del grupo carboxilo (-COO<sup>-</sup>). Después del transporte dentro de las células, el acetato es activado a acetil-CoA la cual interactúa con la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (Co deshidrogenasa) para formar la acetilcoenzima-A-deshidrogenasa. Después, el grupo metilo se transfiere a la vitamina B<sub>12</sub> para producir CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>. A partir de aquí, el grupo metilo se transfiere a la tetrahidrometanopterinina (MP) y después a la coenzima M para dar metil coenzima M (CH<sub>3</sub>-CoM). Esta última se reduce a CH<sub>4</sub> utilizando los electrones generados por la oxidación del CO a CO<sub>2</sub> por la enzima CO deshidrogenasa. La metil coenzima M (CoM) es el intermediario clave para la reducción a metano (Godfried *et al.*, 1988;

Madigan *et al.*, 1998). El transportador de carbono es la tetrahidrometanopterina (MP). Sin importar cual es el sustrato utilizado, la etapa terminal de la metanogénesis es la etapa de conservación de energía. La conversión de  $\text{CH}_3\text{-CoM}$  a  $\text{CH}_4$  está ligada a una bomba de protones que bombea  $\text{H}^+$  hacia la superficie externa de la membrana citoplasmática creando una fuerza motriz protónica. La disipación del gradiente de protones por las ATPasas de translocación de protones dirige la síntesis de ATP, en una forma semejante como lo hacen las eubacterias (Brock y Madigan, 1991). Las bacterias metanogénicas utilizan el ciclo anabólico tricarbóxico para sintetizar el material celular a partir de la acetilcoenzima-A.

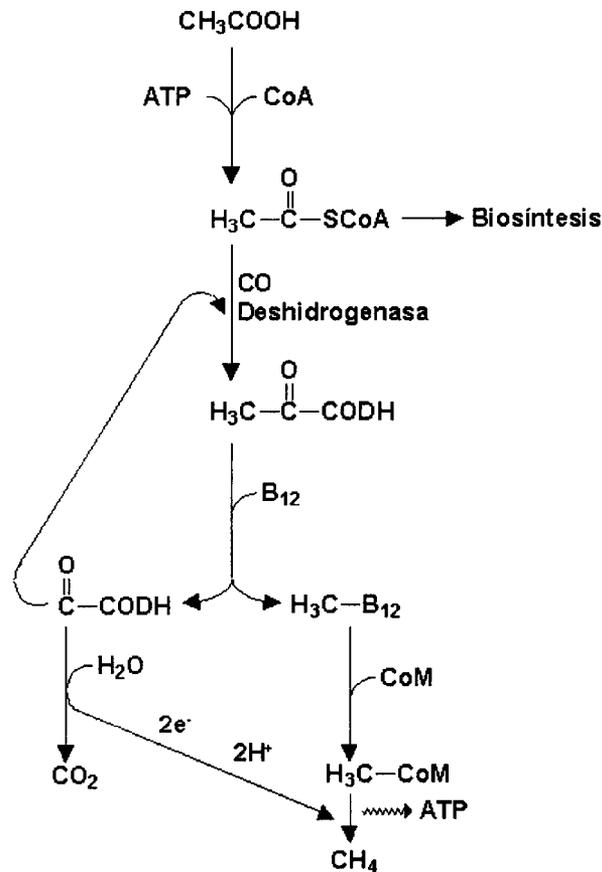


Figura 1.1 Vía de la metanogénesis a partir de acetato (Brock y Madigan, 1991).

### **Principales enzimas que intervienen en la reducción de acetato a metano**

Dado que ambos microorganismos (*Methanosaeta* y *Methanosarcina*) muestran diferentes parámetros cinéticos para su crecimiento en acetato, no es de sorprenderse que tengan diferentes mecanismos de activación. En *Methanosaeta* el acetato es activado por la enzima acetil-CoA sintetasa (Godfried *et al.*, 1988), esta enzima forma acetil CoA con la hidrólisis de un ATP a AMP y P<sub>i</sub>. *Methanosarcina* usa la acetato-cinasa y la fosfotransacetilasa para activar el acetato (Kenealy y Zeikus, 1982). La acetil-CoA es formada a través de la vía acetilfosfato a expensas de un ATP, el cual es hidrolizado a ADP y P<sub>i</sub>.

Ambas enzimas, la acetil-CoA sintetasa y la acetato cinasa son homodiméricas ( $\alpha_2$ ). La acetil-CoA sintetasa constituye arriba del 4% de la fracción proteica soluble y la acetato-cinasa arriba del 1%. Las constantes cinéticas de cada una de las enzimas (acetil-CoA sintetasa y acetato cinasa) de ambos géneros confirman la hipótesis de que *Methanosaeta* predomina en ambientes con concentraciones bajas de acetato, mientras que *Methanosarcina* lo hace en ambientes con altas concentraciones de acetato.

**Monóxido de carbono deshidrogenasa.** Después de la activación del acetato, la acetil CoA formada es dividida en dos unidades C1, una para la reducción del grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) y la otra para la oxidación del grupo carboxilo (-COO<sup>-</sup>) (Thauer *et al.*, 1989). El grupo metilo es reducido a metano, los electrones para esta reducción provienen de la oxidación de CO a CO<sub>2</sub> por la CO-deshidrogenasa. El rompimiento

carbono-carbono y la oxidación del grupo carboxilo es catalizado por la monóxido de carbono deshidrogenasa (Krzycki *et al.*, 1985).

Contraria a otros géneros de metanogénicas, en *Methanosaeta* la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa es más estable a la exposición al oxígeno y al cianuro (Jetten *et al.*, 1989). La deshidrogenasa en ambos microorganismos muestra un alto grado de termoestabilidad.

**Coenzima M.** El grupo metilo de la acetil-CoA es eventualmente convertido a coenzima M (ácido 2-mercaptoetanosulfónico) por las metiltransferasas. La coenzima M fue la primera de las enzimas de la metanogénesis en haber sido descubierta y cuantificada. Transporta un metilo como el último estado de oxidación, derivando en metil-CoM antes de ser totalmente reducido a metano, siendo por lo tanto, el sustrato de la última reacción reductiva que usa como enzima la metil reductasa. Esta reacción está catalizada por un complejo multienzimático A y B, coenzima FAD, coenzima F<sub>420</sub> y F<sub>430</sub> (Rivera-Ramírez *et al.*, 1993).

La enzima metil-CoM reductasa ha sido purificada en *Methanosarcina* y *Methanosaeta* y representa arriba del 10% de la fracción proteica soluble (Rouviere y Wolfe, 1988; Jablonski y Ferry, 1991).

El donador de electrones para la reducción de la metil-CoM es el N-7-mercaptoheptanoltreonina fosfato (HS-HTP) o componente B (Ellerman *et al.*, 1988).

**Otras coenzimas involucradas en la metanogénesis (F<sub>420</sub>, F<sub>430</sub>, metanofurano y metanopterina):**

**Cofactor F<sub>420</sub>**: es un derivado del 8-hidroxi-7-desmetil-5-deazariboflavina en donde el grupo 5'OH ribitilo está enlazado en forma de polifodiestéer con un grupo lactil-oliglutámico, presenta un bajo potencial redox (- 360 mV). Solo es capaz de aceptar o donar (dependiendo de su estado de oxidación) iones hidruro, por lo que se dice que su competencia coenzimática es de solo dos electrones (Rivera-Ramírez *et al.*, 1993). Este cofactor interactúa con diferentes enzimas en la metanogénesis, incluyendo hidrogenasa y NADP<sup>+</sup> reductasa y también juega un papel como donador de electrones en una de las etapas de reducción de CO<sub>2</sub> a metano. La forma oxidada de esta coenzima absorbe la luz a 420 nm y fluoresce a verde-azul. Esta característica es una herramienta muy útil en la identificación preliminar de las bacterias metanogénicas.

**Coenzima F<sub>430</sub>**: Este cofactor es un núcleo tetrapirrólico, amarillo, soluble, que contiene níquel y desempeña una función importante en la etapa final de la metanogénesis como parte del sistema metil reductasa. El níquel es importante en los metanógenos ya que se ha demostrado que la mayor parte del níquel en estos organismos está asociado con el sistema de la metil reductasa/F<sub>430</sub>.

**Metanofurano**: es el primer transportador de CO<sub>2</sub> en uno de los estados de oxidación de la unidad de C1 en la forma de derivado formilo y unido por la cadena lateral aminada del furano.

**Metanopterina:** es una coenzima que contiene un anillo de pterina substituido. Sirve como un portador de C1 durante la reducción de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>. La metanopterina acarrea la unidad C1 durante la mayor parte de las etapas reductoras en la vía metanogénica, a partir de nivel de formilo y metilo (Brock y Madigan, 1991).

### 1.3 EL PAPEL DEL OXÍGENO EN LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

El oxígeno es absolutamente esencial para los organismos aeróbicos; sin embargo, puede ser tóxico a altas concentraciones. Se ha estudiado el mecanismo concerniente a la toxicidad del oxígeno y se ha visto que es tóxico a todas las concentraciones inclusive la del aire, pero los organismos aeróbicos tienen desarrollados mecanismos de protección, tales como algunas enzimas (catalasa y superóxido-dismutasa) (Halliwell, 1977). Los factores fisicoquímicos juegan también un papel muy importante para la tolerancia o toxicidad al oxígeno, así como la naturaleza, el sustrato, la luz y las limitaciones de nutrientes en el cultivo de los microorganismos (Kuenen *et al.*, 1979).

El oxígeno está considerado como un componente tóxico durante los tratamientos anaerobios, especialmente en la metanogénesis, ya que las bacterias que producen metano carecen usualmente de la enzima superóxido-dismutasa. Los microorganismos anaerobios son particularmente vulnerables al oxígeno porque su metabolismo y crecimiento dependen en gran medida de los compuestos susceptibles de autoxidación (SH, proteínas, flavoproteínas, etc.). La presencia de oxígeno en forma libre en los medios anaerobios interfiere con el mantenimiento de

niveles bajos de potencial redox (Eh) (Morris, 1976). Estudios recientes sobre la tolerancia al oxígeno en bicultivos puros de bacterias anaerobias estrictas han demostrado la capacidad de éstas de crecer en presencia de oxígeno (Gerritse *et al.*, 1990; Gerritse y Gottschal 1992; 1993; Guyot *et al.*, 1994; Field *et al.*, 1995).

El aislamiento de bacterias anaerobias facultativas y aerobias estrictas en los digestores ha sido reportado por diversos autores. Los géneros que sobresalen son *Pseudomonas* (Toerien, 1967; Hakulinen *et al.*, 1985) y *Bacillus* (Toerien, 1967; Toerien y Hattingii, 1969; Noeth *et al.*, 1988; Guyot *et al.*, 1994). En todos los casos la presencia de estos géneros está relacionado con la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes, indicando que estos microorganismos podrían estar involucrados en la oxidación parcial de estos compuestos, utilizando el poco oxígeno presente en el agua residual, de tal manera que las bacterias facultativas y metanogénicas continúen con la degradación total hasta metano.

Estos resultados, aunque no muy claros, han permitido el estudio de cocultivos y tricultivos de bacterias metanogénicas y aerobias estrictas o facultativas con el fin de poder establecer las concentraciones permisibles de oxígeno en la metanogénesis y en sulfato reducción (Gerritze y Gottschal, 1993; Chapman *et al.*, 1992; Gottschal y Szewzyk, 1985). En el caso de los cocultivos con bacterias metanogénicas del género *Methanosarcina*, la formación de la biomasa en forma de agregados ha presentado mejores resultados a la tolerancia al oxígeno, ya que esto minimiza los efectos al interior de los agregados (Gerritze y Gottschal, 1993). Pocos experimentos

han sido llevados a cabo para probar el grado de tolerancia al oxígeno en los digestores anaerobios.

En el caso de los digestores anaerobios se ha encontrado que los lodos que presentan una mayor cantidad de bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas presentan mayor actividad metanogénica, ya que el oxígeno presente en éstos es consumido por estas bacterias haciendo las condiciones mas reducidas para la metanogénesis (Scott *et al.*, 1985; Guyot y Fajardo, 1993; Kato *et al.*, 1993). Los valores de  $K_s$  de las bacterias aerobias demuestran que la afinidad para el oxígeno es alta y que los sustratos (etanol, AGV entre otros) empleados por las bacterias aerobias o facultativas son el factor más importante para lograr esta tolerancia (Kato *et al.*, 1993).

Con tratamientos aerobios y anaerobios por separado en muchas ocasiones se logra únicamente la biodegradación parcial de algunos compuestos recalcitrantes. Sin embargo, con la combinación de los dos consorcios microbianos en un solo reactor se puede obtener una biodegradación total, dado que las bacterias aerobias consumirán el oxígeno en la oxidación parcial del compuesto y mantendrán las condiciones reducidas con el fin de que las anaerobias estrictas puedan lograr la degradación total (Field *et al.*, 1995). Tal es el caso de la acetamida, compuesto xenobiótico altamente utilizado en la industria, cuya degradación anaerobia hasta metano es llevada a cabo por la asociación de dos bacterias, una bacteria aerobia estricta (*Bacillus sphaericus*) y una bacteria metanogénica del género *Methanosarcina* (Guyot *et al.*, 1994; 1995). Es importante desde este punto de vista

conocer las características del género *Bacillus* para relacionarlas con las que presentan las bacterias metanogénicas.

Las bacterias metanogénicas tienen características muy diferentes a las bacterias clásicas, por lo que su cultivo y conservación en los sistemas de tratamiento son muy específicos, pero cuando se encuentran en cultivos mixtos con bacterias aerobias estrictas o facultativas pueden cohabitar en el mismo sistema, ya que el oxígeno que pudiera ser tóxico para su crecimiento, sería consumido por estas bacterias.

#### **1.4 EL GÉNERO *Bacillus***

El principal grupo de bacterias formadoras de endosporas es el de la familia Bacillaceae, la cual comprende 5 géneros ampliamente reconocidos: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* y *Sporosarcina* (Buchanan y Gibbons, 1974; Holt, *et al.*, 1994).

El género *Bacillus* por su gran contribución en el desarrollo de la microbiología, es el más importante de la familia Bacillaceae. Fue primeramente reportado por Cohn (1872), quién nombró por primera vez a *Bacillus subtilis* como la primera especie de este género. La resistencia de las esporas al calentamiento fue reportada posteriormente por este mismo autor. Se hizo la primera clasificación a partir de 621 cepas aisladas (Smith *et al.*, 1946). El esquema descrito por Gibson y Gordon en el Bergey's Manual (Buchanan y Gibbons, 1974) es similar en algunos aspectos (Tabla 1.2).

El género *Bacillus* pertenece a la subdivisión de las bacterias Gram (+) de bajo GC%. Se distingue de otras bacterias formadoras de endosporas por su forma y porque usualmente producen catalasa, con endosporas muy resistentes y no más de una por célula, la esporulación no se encuentra reprimida por su exposición al aire.

Pueden ser Gram positivas, variables o negativas, con flagelos peritricos (formados alrededor de la célula), aerobias, facultativas o microaerófilas. El oxígeno es el principal aceptor terminal de electrones, pero en ausencia de oxígeno pueden usar otros compuestos. La morfología colonial es muy variable, algunas especies producen pigmentos dependiendo de la composición del medio de cultivo. Presentan una gran diversidad y habilidad fisiológicas: de psicrófilas a termófilas, de acidófilas a alcalófilas, algunas cepas son tolerantes a la sal, otras presentan requerimientos específicos por algunas sales. La enzima catalasa es formada por la mayoría de las especies y la enzima oxidasa puede estar o no presente (Mortimer *et al.*, 1981). Muchas especies de *Bacillus* crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., como únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno; algunas especies tienen necesidad de vitaminas.

**Tabla 1.2. Características diferenciales de las especies del género *Bacillus* (Claus y Berkeley, 1986).**

Características	<i>B. subtilis</i>	<i>B. acidocaldarius</i>	<i>B. alcalophilus</i>	<i>B. alvei</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. azotoformans</i>	<i>B. badius</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. cereus</i>
Células > 1.0 µm	-	ND	-	-	+	-	V	-	+
Esporas redondas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hinchamiento del esporangio	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Cristal paraesporal	-	ND	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	ND	+	+	+	-	+	+	+
Crecimiento anaerobio	-	-	-	+	+	-	-	-	+
pH < 6.0	d	ND	ND	+	+	ND	-	-	+
pH > 7.0	-	ND	ND	-	-	ND	+	+	-
Acidez (glucosa)	+	ND	+	+	+	-	-	d	+
Acidez (arabinosa)	+	ND	+	-	-	ND	-	-	-
Acidez (xilosa)	+	ND	+	-	-	-	-	-	-
Acidez (D-manitol)	+	ND	+	-	-	-	-	d	-
Gas (glucosa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	+	ND	+	+	+	ND	+	+	+
Gelatina	+	ND	+	+	+	-	ND	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Citrato	+	-	-	-	d	+	-	d	+
Tirosina	-	ND	-	d	d	-	+	+	+
Fenilalanina	-	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Lecitinasa	-	ND	-	-	+	-	ND	-	+
Reducción de nitrato	+	ND	-	-	+	ND	-	d	+
Formación de indol	-	-	-	+	ND	-	-	-	-
NaCl y KCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar nutritivo a:									
pH 6.8	+	-	-	+	+	+	+	+	+
pH 5.7	+	d	-	-	+	-	-	d	+
NaCl al:									
5 %	+	ND	.	d	+	-	+	-	ND
7%	+	ND	-	-	+	-	ND	-	d
10 %	ND	ND	--	-	ND	-	-	-	ND
Temperatura:									
5 °C.	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-
10 °C	d	-	ND	-	-	ND	-	-	d
30 °C	+	-	+	+	+	+	+	d	+
40 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	d
50 °C	d	+	-	-	-	-	+	d	-
65 °C	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lisozima	d	ND	-	+	+	-	-	d	+

Símbolos: (-) mas del 90% son negativas; (+) mas del 90 % son positivas; (v) variables; (d) pueden ser positivas o negativas; (ND) no determinado; (NG) no presenta crecimiento.

Tabla 1.2. (continuación).

Características	<i>B. circulans</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. fastidiosus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. globisporus</i>	<i>B. insolitus</i>	<i>B. larvae</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>B. lentimorbus</i>
Células > 1.0 µm	-	-	+	-	-	v	-	-	-
Esporas redondas	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Hinchamiento del esporangio	+	v	-	-	+	-	+	+	+
Cristal paraesporal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Crecimiento anaerobio	d	+	-	-	-	-	+	+	+
pH < 6.0	+	+	NG	-	-	-	d	d	d
pH > 7.0	-	-	NG	-	-	-	-	-	-
Acidez (glucosa)	+	+	NG	+	+	-	+	+	+
Acidez (arabinosa)	+	d	NG	-	-	-	-	-	-
Acidez (xilosa)	+	d	NG	-	-	-	-	-	-
Acidez (D-manitol)	+	d	NG	+	-	-	d	+	-
Gas (glucosa)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseína	d	d	-	+	d	-	+	+	-
Gelatina	d	-	-	+	+	-	+	d	-
Almidón	+	+	-	+	d	-	-	-	-
Citrato	d	d	-	-	-	-	-	-	-
Tirosina	-	-	-	d	-	-	-	+	-
Fenilalanina	-	-	-	d	+	d	-	-	-
Lecitinasa	-	-	-	-	ND	ND	ND	+	ND
Reducción de nitrato	d	d	-	d	d	-	d	+	-
Formación de indol	-	-	ND	-	-	-	-	d	-
NaCl y KCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar nutritivo a:									
pH 6.8	+	+	-	+	+	+	-	+	-
pH 5.7	d	+	-	-	-	-	-	-	-
NaCl al:									
5 %	d	-	+	+	-	-	-	d	-
7%	d	-	-	+	-	-	-	-	-
10 %	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
Temperatura:									
5 °C.	-	-	-	-	+	+	-	-	-
10 °C	d	-	+	d	+	+	-	-	-
30 °C	+	+	+	+	d	-	+	+	+
40 °C	+	+	+	+	-	-	+	d	-
50 °C	-	+	-	-	-	-	-	-	-
65 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisozima	d	-	ND	-	-	-	+	+	+

Símbolos: (-) mas del 90% son negativas; (+) mas del 90 % son positivas; (v) variables; (d) pueden ser positivas o negativas; (ND) no determinado; (NG) no presenta crecimiento.

Tabla 1.2. (continuación).

Características	<i>B. lentus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. macerans</i>	<i>B. macquariensis</i>	<i>B. marinus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. panthotenticus</i>
Células > 1.0 µm	-	-	-	-	v	+	+	-
Esporas redondas	-	-	-	-	+	v	-	v
Hinchamiento del esporangio	-	-	+	+	-	-	-	+
Cristal paresporal	-	-	-	-	-	-	-	-
catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaerobio	-	+	+	+	-	-	+	+
pH < 6.0	-	+	+	+	ND	d	+	+
pH > 7.0	ND	-	-	-	ND	-	-	-
Acidez (glucosa)	+	+	+	+	+	+	+	+
Acidez (arabinosa)	+	+	+	-	-	d	-	-
Acidez (xilosa)	+	+	+	+	d	d	-	-
Acidez (D-manitol)	+	+	+	+	-	d	-	-
Gas (glucosa)	-	-	+	-	-	-	-	-
Caseína	d	+	-	-	d	+	+	d
Gelatina	d	+	+	-	+	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	-	+	+	+
Citrato	-	+	d	-	-	+	d	-
Tirosina	-	-	-	-	ND	d	d	-
Fenilalanina	d	-	-	-	ND	d	-	d
Lecitinasas	-	-	-	ND	ND	-	d	-
Reducción de nitrato	d	+	+	-	d	d	+	d
Formación de indol	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl y KCl	-	-	-	-	+	-	-	-
Agar nutritivo a:								
pH 6.8	+	+	+	+	-	+	+	+
pH 5.7	-	+	+	-	ND	d	+	-
NaCl al:								
5 %	ND	+	-	-	ND	ND	ND	+
7 %	d	+	-	-	d	d	d	+
10 %	ND	ND	-	-	-	ND	ND	+
Temperatura:								
5 °C	ND	-	-	+	+	d	-	-
10 °C	ND	-	d	+	+	+	d	-
30 °C	+	+	+	-	d	+	+	+
40 °C	ND	+	+	-	-	d	d	+
50 °C	-	+	d	-	-	-	-	d
65 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisozima	-	d	-	-	ND	-	+	-

Símbolos: (-) mas del 90% son negativas; (+) mas del 90 % son positivas; (v) variables; (d) pueden ser positivas o negativas; (ND) no determinado; (NG) no presenta crecimiento.

Tabla 1.2. (continuación).

Características	<i>B. pasteurii</i>	<i>B. polymixa</i>	<i>B. popilliae</i>	<i>B. pumilis</i>	<i>B. schlegelii</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Células > 1.0 µm	-	-	-	-	-	-	-	+
Esporas redondas	+	-	-	-	+	+	-	-
Hinchamiento del esporangio	+	+	+	-	+	+	+	-
Cristal paresporal	-	-	+	-	-	-	-	d
Catalasa	ND	+	-	+	+	+	d	+
Crecimiento anaerobio	+	+	+	-	-	-	-	+
pH < 6.0	ND	d	d	+	ND	-	+	+
pH > 7.0	ND	-	-	-	ND	+	-	-
Acidez (glucosa)	ND	+	+	+	-	-	+	+
Acidez (arabinosa)	ND	+	-	+	-	-	d	-
Acidez (xilosa)	ND	+	-	+	-	-	d	-
Acidez (D-manitol)	ND	+	-	+	-	-	d	-
Gas (glucosa)	-	+	-	-	-	-	-	-
Caseína	d	+	-	+	-	d	d	+
Gelatina	+	+	-	+	-	d	+	+
Almidón	-	+	-	-	-	-	+	+
Citrato	ND	-	-	+	-	ND	ND	ND
Tirosina	ND	-	-	-	-	-	-	d
Fenilalanina	ND	-	-	-	ND	+	-	-
Lecitinasa	-	-	ND	-	-	-	ND	d
Reducción de nitrato	+	+	-	-	+	-	d	+
Formación de indol	ND	-	-	-	-	-	-	-
NaCl y KCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar nutritivo a:								
pH 6.8	-	+	-	+	+	+	+	+
pH 5.7	-	+	-	+	-	d	-	+
NaCl al:								
5 %	+	-	-	+	-	d	d	+
7 %	+	-	-	+	-	d	-	+
10 %	+	-	-	ND	-	-	-	ND
Temperatura:								
5 °C	ND	d	-	-	-	-	-	-
10 °C	ND	+	-	-	-	-	-	d
30 °C	+	+	+	+	-	+	-	+
40 °C	d	+	-	+	-	d	+	+
50 °C	-	-	-	d	+	-	+	-
65 °C	-	-	-	-	+	-	+	-
Lisozima	ND	d	+	d	+	d	-	+

Símbolos: (-) mas del 90% son negativas; (+) mas del 90 % son positivas; (v) variables; (d) pueden ser positivas o negativas; (ND) no determinado; (NG) no presenta crecimiento.

Muchos bacilos producen enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, permitiendo que los productos de hidrólisis de estos compuestos sean utilizados como fuente de carbono y donadores de electrones. Muchas cepas de este género producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, tirocidina, gramicidina y circulina. En la mayoría de los casos, la producción de antibióticos parece relacionarse con el proceso de esporulación, y el antibiótico se libera cuando el cultivo entra en la fase estacionaria de crecimiento y después de la esporulación. Ciertos bacilos son patógenos a insectos debido a una proteína cristalina tóxica que interfiere con el desarrollo de las larvas y se utilizan como insecticidas biológicos (Claus y Berkeley, 1986).

#### **1.4.1 Morfología**

Las células de *Bacillus* pueden presentarse simples o formando cadenas, las cuales pueden ser muy largas. El bastón puede ser de terminación redonda o recta y puede ser de tamaño pequeño o grande (0.5-1.2 por 2.5-10  $\mu\text{m}$ ). El citoplasma puede ser vacuolado y las células pueden tener cuerpo paraesporal. La forma de las endosporas y la forma del soporte de la célula madre, el esporangio, es una característica presente en las cepas de *Bacillus*. Las endosporas son generalmente cilíndricas, elipsoidales, ovales o redondas, pero algunas especies producen esporas en forma de plátano o en forma de riñón. La espora puede presentarse en la posición central, subterminal o lateral dentro del esporangio. Durante la formación de la endospora, la célula madre puede no cambiar de forma o puede hincharse.

Gordon *et al.* (1973) clasificaron al género *Bacillus* en tres grupos de acuerdo a la forma de las esporas y del esporangio. El grupo 1 tiene esporas elipsoidales sin hinchamiento en el esporangio; el grupo 2 tiene esporas elipsoidales con hinchamiento del esporangio y el grupo 3 presenta esporas esféricas con hinchamiento en el esporangio. Las endosporas maduras son expulsadas del esporangio como resultado de una lisis.

#### **1.4.2 Composición de la pared celular**

La fracción peptídica de la mureína (peptidoglicano) presente en todas las especies de *Bacillus* contiene principalmente ácido meso-diaminopimérico (meso-DAP). Sin embargo, solamente en 17 cepas se ha estudiado la composición de mureína.

De acuerdo a Ranftl (1972) el tipo de mureína encontrada en 5 cepas de *Bacillus sphaericus* contienen L-Lysina-D-Aspártico, este estudio se confirma con uno realizado por Hungerer y Tipper (1969). Otra composición de mureína encontrada en cepas de *Bacillus pasteurii* es L-Lysina- L-Alanina-D Aspártico. En esporas de *B. sphaericus* y *B. pasteurii* se ha encontrado el compuesto meso-DAP. También se han encontrado los ácido teicoico y teicurónico en varias cepas de *Bacillus* (Claus y Berkeley, 1986).

Las células vegetativas forman capas cristalinas que cubren completamente la superficie de la célula. Estas capas están compuestas de proteínas y glicoproteínas y poseen un alto grado de regularidad estructural. Estos tipos de estructuras se presentan de diferente forma, pueden ser de forma hexagonal, cuadrada u oblicua

(Claus y Berkeley, 1986). Estudios realizados con 39 cepas de *B. stearothermophilus* demostraron la presencia de una capa cristalina. De todas las cepas se encontró solo una de forma hexagonal, 15 de forma cuadrada y 14 de forma oblicua. Con *B. sphaericus*, esta estructura ha sido observada solamente en 31 cepas de las 61 estudiadas (Heinz *et al.*, 1986).

### 1.4.3 Otras estructuras

**Cápsulas:** muchas cepas de *Bacillus* producen cápsulas compuestas de carbohidratos. *B. circulans* produce exopolímeros extracelulares de glucosa y ácido urónico. *B. anthracis*, en presencia de CO<sub>2</sub> en la atmósfera produce una cápsula de poli- $\gamma$ -glutamil-glucosa. *B. megaterium* puede sintetizar una cápsula fibrilar de polisacáridos y polipéptidos (Claus y Berkeley, 1986).

**Flagelos:** muchas de las especies de *Bacillus* son móviles por movimientos peritricos. Para determinar los flagelos se han utilizado serotipos H. La composición de los flagelos de *B. subtilis* ha sido determinada por DeLange *et al.* (1976). Dieciséis cepas de *B. subtilis* están divididas en 5 grupos sobre la base de la antigenicidad de los filamentos de sus flagelos, todos ellos relacionados con la cantidad de fenilalanina y tirosina. La secuencia de aminoácidos en los flagelos de *B. firmus*, explica por ejemplo porque esta cepa es tan estable en microambientes a pH altos (> 11).

#### **1.4.4 Característica colonial**

La apariencia de las colonias de *Bacillus* es muy variable, dependiendo de los factores ambientales, temperatura, humedad, pH y composición del medio de cultivo. Una descripción de las colonias de *Bacillus* fue reportada por Smith *et al.* (1952). La variación en las colonias también ha sido observada principalmente con las cepas de *B. subtilis* y especies relacionadas. Por ejemplo, con *B. pumilis* (ATCC 27142), se han observado colonias rojas y moteadas. Este cambio en la forma de la colonia se debe al tipo de peptona utilizado en el medio de cultivo, pueden presentarse también diferencias en la altura de las colonias. En *B. mycoides* se presenta un crecimiento rizoide cubriendo la placa de cultivo a las 48 horas de incubación, la dirección del crecimiento puede deberse al pH del medio. La forma no rizoide de *B. mycoide* presenta la misma apariencia que para *B. cereus*.

Algunas cepas de *Bacillus* se presentan en forma de enjambres en medio sólido. Se ha observado migración en algunas colonias de *B. alvei*, *B. circulans* y *B. sphaericus* bajo ciertas condiciones de cultivo. Esta migración ha presentado velocidades de hasta 15 mm/h.

Colonias de cultivos puros de *Bacillus* muestran algunas diferencias en cuanto a la apariencia opaca o translúcida de las colonias, que presentan algunas veces una coloración crema, esto puede ser debido a las diferentes etapas de esporulación (Claus y Berkeley, 1986).

Muchas de las especies de *Bacillus* forman pigmentos, por ejemplo: *B. megaterium* forma un pigmento amarillo cuando se desarrolla en un medio con caseína; *B.*

*fastidiosus* forma un pigmento anaranjado cuando crece por tiempos prolongados con alantoína, *B. subtilis* forma un pigmento negro azulado solamente cuando crece con carbohidratos, otras cepas de *Bacillus* también producen diferentes pigmentos: rosa en las cepas de *B. firmus*, café rojizo en *B. licheniformis*, rojo o naranja en *B. pulvifaciens*, rosa y café en *B. sphaericus* y amarillo, rosa, naranja y café en *B. subtilis* (Gordon *et al.*, 1973). Algunas cepas de *B. cereus* y *B. subtilis* excretan un pigmento verde-amarillo fluorescente (Smith *et al.*, 1952).

Las cepas que producen más pigmentos son las que crecen en suelos con altas concentraciones de sales (*B. firmus* y *B. circulans*) (Gordon y Smith, 1973; Krieg, 1981).

#### 1.4.5 Ciclo de vida

Muchas de las especies de *Bacillus* son potencialmente hábiles para formar células resistentes en la etapa final de la fase exponencial de crecimiento o si las células son transferidas de un medio complejo a uno simple. Estas células están formadas intracelularmente y son llamadas endosporas. Las cepas de *Bacillus* no forman endosporas bajo todas las condiciones de cultivo por lo que es importante desde el punto de vista taxonómico para la identificación del género. Muchas de las cepas de *Bacillus* forman endosporas en medios con sales de manganeso, pero esta propiedad puede cambiar después de repetidas transferencias. Otros factores que afectan la formación de esporas son la temperatura, pH, aireación, presencia de

minerales, ciertas fuentes de carbono y nitrógeno, y la concentración de la fuente de carbono (Krieg, 1981).

La formación de endosporas es un proceso multifase: fase 0: crecimiento de la célula vegetativa; fase I: el ADN forma un filamento axial; fase II, separación del cromosoma formando células asimétricas; fase III: hundimiento de la forespora; fase IV: formación de la corteza; fase V: la cubierta de la espora es sintetizada; fase VI: maduración de espora y fase VII: lisis del esporangio y liberación de la espora madura. Las endosporas corresponden a la forma de letargo de las células. La transformación de una espora a célula vegetativa, generalmente envuelve tres procesos secuenciales: activación, germinación y crecimiento. La activación se puede llevar a cabo por medio de calentamiento durante 10-30 minutos a una temperatura apropiada. Las endosporas de algunas cepas presentan germinación y crecimiento sin una etapa previa de activación, esto depende de las condiciones en las cuales las endosporas han sido formadas. Por ejemplo, las endosporas de *B. fastidiosus* necesitan un calentamiento para su activación solamente en un medio que contenga iones manganeso. Algunas esporas pueden activarse también a bajas temperaturas; sin embargo, es poca la población que llega a germinar (Gordon *et al.*, 1973).

La germinación es el cambio en la actividad de la endospora y puede llevarse a cabo en minutos. Los cambios que se llevan a cabo en la germinación son la despolimerización y excreción de la espora.

El crecimiento es definido como el desarrollo de la célula vegetativa de la endospora germinada. Después de que la germinación termina, la célula vegetativa joven sale, se elonga y se divide (Gordon *et al.*, 1973).

#### **1.4.6 Nutrición y condiciones de crecimiento**

Dada la diversidad de este género, existe un gran rango de requerimientos nutricionales. La mayoría de las cepas crecen bien en agar nutritivo, excepto *B. fastidiosus*, el cual requiere alantoína o ácido úrico en el medio. *B. pasteurii* necesita un medio con alto pH y alta concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Algunas cepas de *B. sphaericus* necesitan tiamina y biotina para su crecimiento (Smith *et al.*, 1952).

La clasificación de los microorganismos en base a sus requerimientos nutricionales estudiados por Gordon *et al.* (1973), se relacionan con la forma de la espora y del esporangio. Así, los del grupo 1 crecen bien en medios simples, mientras que los del grupo 2 necesitan medios más complejos y los del grupo 3 son las especies que requieren factores de crecimiento para crecer.

Algunas especies de este género como *B. lentimorfus*, *B. insolitus*, *B. fastidiosus* y *B. sphaericus* no son capaces de utilizar azúcares para su crecimiento. Esta última por ejemplo, utiliza algunos ácidos orgánicos como fuentes de carbono y energía e hidrolizan caseína, gelatina y urea. Otras consumen piruvato y citrato, y ninguna cepa utiliza el almidón.

Koser en 1968 hizo una revisión de las vitaminas que requiere este género, pero para los termófilos ciertos aminoácidos y vitaminas pueden variar con la temperatura de incubación (Krieg, 1981).

La presencia de nitrógeno puede no ser necesaria dada la capacidad que tienen algunas especies para fijar nitrógeno (*B. polymixa* y *B. macerans*, por citar algunos ejemplos).

La reducción del nitrato es una propiedad común de este género; *B. azotoformans*, *B. licheniformis* y algunas otras cepas producen cantidades considerables de  $N_2$  o  $N_2O$ . Algunas otras cepas pueden metabolizar compuestos aromáticos y otros compuestos complejos.

La habilidad de las especies de *Bacillus* de crecer en bajas y altas temperaturas, bajos y altos pH, ha sido discutido por Norris (1981). Las especies termófilas y alcalófilas son consideradas muy importantes porque poseen ciertas enzimas de interés comercial.

Algunas cepas necesitan altas concentraciones de selenio (30-100 mM) en el medio de cultivo para crecer, pero si se les cultiva en un medio de infusión de sangre o tripticasa de soya pueden crecer sin este elemento (Krieg, 1981).

#### **1.4.7 Genética**

El porcentaje mol de guanina- citosina (G+C) del ADN de las cepas del género *Bacillus* difiere en un 30% indicando que este género presenta una gran

heterogeneidad genética. Por ejemplo: 31.7% de G+C para *B. cereus* y 69% de G+C para *B. thermocatenulatus*.

Uno de los problemas en la evaluación de los datos de la composición del ADN en el género *Bacillus* es que para una misma cepa los autores reportan diferencias por arriba del 14 mol% G+C cuando en otras especies la diferencia en la composición del ADN no es mayor del 2% (Claus y Berkeley, 1986).

Ha sido parcialmente satisfactorio el uso de métodos convencionales para la localización taxonómica de *Bacillus* mediante la técnica por desnaturalización térmica y densidad flotante. Esto es evidente debido al rango de la composición base del ADN encontrada dentro de algunas especies. Las propiedades fenotípicas tan diferentes de algunas especies no justifican una verdadera localización genética. La aplicación de la técnica de reasociación del ADN muestra algunos progresos en la taxonomía del género *Bacillus*.

A través de los estudios de reasociación del ADN y con el método por composición de bases de ADN se ha demostrado la heterogeneidad de las especies de *Bacillus*. Sin embargo, otros estudios han demostrado que *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringensis* presentan una alta homología con las otras cepas de su especie por lo que pueden considerarse como especies simples.

La gran diferencia en la composición de base de ADN de 30-70% G + C sugiere que el género *Bacillus* comprende especies diferentes del género "natural", confirmando esto con los estudios de Seki *et al.* (1978), quienes realizaron estudios de homología de ADN-ADN y encontraron que muy pocas especies de *Bacillus* presentan cierta

homología. Se sugiere que esta separación en el género podría estar basada no solamente en la homología de ADN, por lo que incluyeron estudios filogenéticos de la secuencia de 16 RNA ribosomal. Por medio de estudios de ADN-RNA se ha encontrado una gran homología entre *Sporosarcina ureae* y algunas especies de *Bacillus*, presentando una composición de ADN base muy similar. La relación filogenética encontrada en *S. ureae* y *Bacillus* por la secuencia de 16s ARN ribosomal hace que se incluya a *S. ureae* en el género *Bacillus*. Estudios detallados de espectros de ADN han demostrado ser una buena razón para que el género *Bacillus* se considere una taxa filogeneticamente homogénea, pero que no puede ser considerado como un género simple ya que los resultados de *B. subtilis* y *B. pumilis*, de acuerdo al estudio de 16 ARN ribosomal, son similares con algunas especies de enterobacterias (Claus y Berkeley, 1986).

#### **1.4.8 Sensibilidad a los antibióticos**

Algunas especies de *Bacillus* son patógenas oportunistas, este género con la excepción de *B. anthracis* es de gran interés para la Microbiología Médica, ya que su sensibilidad a los antibióticos es poca. *Bacillus alvei*, *B. laterosporus* y *B. stearothermophilus* son resistentes a la sulfonamida. *B. coagulans* presenta mayor sensibilidad a algunos antibióticos que *B. stearothermophilus*. Cepas de *B. marinus* son diferentes en la sensibilidad a la penicilina y terramicina. *B. cereus* muestra alta resistencia a la ampicilina, colistina y polimixina, y *B. anthracis* es muy sensible a la penicilina (Claus y Berkeley, 1986).

Gran resistencia a la eritromicina, cloramfenicol y tetraciclina se ha encontrado en *B. licheniformis* y *B. sphaericus* (Burke y McDonald, 1983). Con excepción de la tetraciclina, la resistencia a los antibióticos no está asociada con plásmidos. El tipo y concentración de antibiótico puede afectar la esporulación, la germinación o el crecimiento de la cepa en forma diferente a cada una de las especies (Claus y Berkeley, 1986). *B. sphaericus* produce grandes cantidades de la enzima penicilina-amino hidrolasa. Esta enzima hidroliza la penicilina a ácido 6-amino penicilánico (6APA), un intermediario clave para la producción de penicilina semisintética, (Pundle y Raman, 1994).

#### **1.4.9 Patogenicidad**

El género *Bacillus* es reconocido por su patogenicidad, tanto en mamíferos como en insectos. *B. anthracis* es la especie mejor conocida de este género que es patógeno en animales y el hombre al infectarse con leche o carne de animales contaminados con carbunco. La vacunación en la población así como el uso de penicilina ha disminuido en gran parte esta enfermedad. Recientemente, se ha aislado una cepa que es resistente a la penicilina. Se sabe que el factor 1 (edema del carbunco), es causado por la adenilato-cinasa, aunque las bases moleculares no están todavía del todo establecidas, por lo que bajo condiciones adversas esta enfermedad puede ser un problema mayor para la población (Norris, 1981).

*B. cereus*, es otra especie de este género que resulta ser también patógeno en el hombre y en animales. Este organismo es la causa de dos tipos de envenenamiento en peces, así como otras especies (*B. brevis*, *B. licheniformis*, y *B. sphaericus*).

*B. sphaericus* y *B. thuringensis* no solamente son patógenos en insectos sino también en mamíferos. Gordon *et al.* (1973) reportaron el aislamiento de una cepa de *B. thuringensis* en un caso fatal de mastitis bovina.

Debido al uso de algunas cepas de *Bacillus* como insecticidas biológicos se han ocasionado enfermedades también en humanos, tal es el caso de una infección en los ojos en una persona sana por una salpicadura de *B. thuringensis*. Una cepa de *B. sphaericus* también ha causado meningitis, bacteremia y endocarditis en personas sanas (Krieg, 1981).

#### **1.4.10 Ecología**

Debido a la resistencia de sus endosporas a condiciones adversas del medio ambiente, las cepas de *Bacillus* pueden ser aisladas de una gran variedad de hábitats, por lo que no es posible considerar las especies en términos de ecosistema. Existen algunos reportes de la presencia de cepas de *Bacillus* en ciertos hábitats, pero a veces las esporas se encuentran en el aire.

Está generalmente aceptado que el hábitat primario de la mayoría de las cepas de *Bacillus* es el suelo, formando parte de la flora bacteriana zimógena. Es importante recordar que juegan un papel muy importante en el ciclo del nitrógeno y carbono,

dado que algunas especies pueden degradar una gran cantidad de biopolímeros (Norris, 1981).

Es importante señalar que debido a la gran diversidad y a la importancia que existe entre las especies del género *Bacillus*, su estudio se ha enfocado principalmente a la utilización de enzimas, bioinsecticidas, patogenicidad en humanos, etc.

Algunas especies del género *Bacillus* han sido aisladas de digestores anaerobios formando parte de la microflora y participando en los procesos de degradación de la materia orgánica (Toerien, 1967; Toerien y Hatting, 1969; Noeth, 1988; Van Assche, 1982; Guyot *et al.*, 1994; 1995). Sin embargo, el estudio de interacciones de bacterias aerobias y anaerobias en reactores es todavía un tema muy poco estudiado.

### **1.5 REACTORES DE LECHO DE LODOS DE FLUJO ASCENDENTE (UASB)**

El reactor de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB) fue desarrollado por Lettinga *et al.* (1980). Este reactor opera con flujo ascendente, el cual ejerce una cierta selectividad sobre los microorganismos presentes y favorece así, la retención de la biomasa en forma de gránulos con buenas propiedades de sedimentación, dando como resultado una cama o lecho en la parte inferior del reactor. La parte superior del reactor está equipada de un separador gas-líquido-sólido, el cual evita la salida de los sólidos suspendidos en el efluente y favorece la evacuación del gas y la decantación de los sólidos que eventualmente llegan a la parte superior (Noyola *et al.*, 1988). El influente a tratar es uniformemente distribuido en la base del reactor y

pasa a través del lecho, para que los microorganismos transformen la materia orgánica en biogás ( $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ ), que se evacua por la parte superior.

El aspecto fundamental del sistema UASB lo constituye la biomasa granular, indispensable para su buen funcionamiento. La característica de estos gránulos es contar con una actividad metanogénica elevada y alta capacidad de decantación lo que favorece un alto grado de retención en el reactor, con lo que se logran bajos tiempos de retención hidráulicos y altos tiempos de retención celular (Lettinga *et al.*, 1982).

La formación de agregados granulares favorece la relación sintrófica entre los microorganismos presentes en el lecho, al mismo tiempo que los protege contra los cambios ambientales adversos.

Un gránulo está compuesto de la manera siguiente (Guiot *et al.*, 1991; Alibhaik *et al.*, 1986; McCarty y Smith, 1986):

- Un núcleo compuesto principalmente de las bacterias más sensibles y con alta afinidad por el acetato, por ejemplo, las bacterias del género *Methanosaeta*.
- Una capa intermedia en donde se encuentran una gran variedad de bacterias en forma de cocos y bacilos que pueden ser bacterias acetogénicas, metanogénicas e hidrogenofílicas, como las pertenecientes al género *Methanobrevibacter*.

- Una capa externa donde predominan las bacterias acidogénicas, sulfato reductoras y algunas metanogénicas de los géneros *Methanosarcina*, *Methanococcus* y *Methanobacterium*.

Aunque el proceso de granulación no es claro, se puede explicar basándose en el mecanismo de la formación de las biopelículas, para esto Schmidt y Ahring (1996) proponen cuatro etapas en el proceso de granulación:

- 1) Transporte de la célula a la superficie de otra ya sea por difusión (movimiento Browniano), por convección o por un movimiento activo (flagelos).
- 2) Adsorción al sustrato por fuerzas fisicoquímicas, como interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals (fuerzas atractivas entre las células).
- 3) Adhesión de las células al sustrato por apéndices celulares o por ataque del sustrato por la misma célula.
- 4) Multiplicación de la célula y desarrollo del gránulo.

Algunos factores como pH, T, oxígeno y carga orgánica, entre otros, pueden afectar el proceso de granulación.

El diseño del reactor UASB presenta ciertas ventajas con respecto a reactores anaerobios con biomasa dispersa o suspendida para tratar efluentes industriales, ya que al retener la biomasa en forma de un lecho de gránulos protege a las bacterias anaerobias estrictas, principalmente a las metanogénicas, de ciertas condiciones adversas y mantiene a las bacterias anaerobias facultativas o aerobias suspendidas en el reactor.

## **1.6 JUSTIFICACIÓN**

La degradación de la acetamida a partir de lodos anaerobios es llevada a cabo por una bacteria aerobia estricta del género *Bacillus* y una bacteria anaerobia estricta del género *Methanosarcina*. El modelo estructural del gránulo anaerobio estudiado por Guiot y Costerton (1981), explica muy bien las interacciones que ocurren entre las bacterias anaerobias estrictas y las bacterias facultativas, sin embargo, no está bien definido como participan las bacterias aerobias estrictas. Aislado y caracterizando las bacterias responsables de la degradación de la acetamida, será posible establecer las condiciones para una operación sinérgica y de esta manera aportar bases hacia la integración de procesos aerobios-anaerobios que permitan la degradación de compuestos recalcitrantes en un mismo sistema de tratamiento.

## 1.7 OBJETIVOS

### 1.7.1 General

Evaluar la participación conjunta de una bacteria aerobia estricta (*B. sphaericus*) y una bacteria metanogénica (*Methanosarcina mazei*) en la degradación de acetamida.

### 1.7.2 Específicos

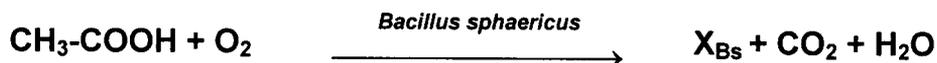
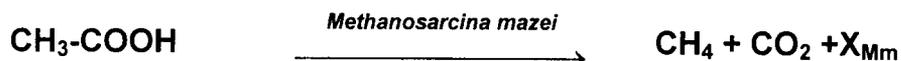
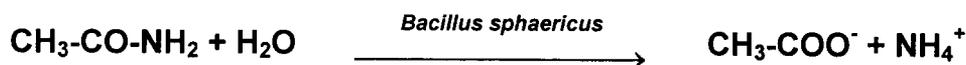
- ◆ Evaluar fisiológica, taxonómica y metabólicamente a la cepa de *Bacillus sphaericus*.
- ◆ Determinar las constantes cinéticas ( $\mu_{\max}$  y  $K_s$ ) y el rendimiento celular ( $Y$ ) de *B. sphaericus* en un reactor continuo con retención de biomasa.
- ◆ Determinar las constantes cinéticas ( $\mu_{\max}$  y  $K_s$ ) y el rendimiento celular ( $Y$ ) de *M. mazei* en un cultivo intermitente.
- ◆ Evaluar la producción de metano por medio de un bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en un reactor continuo con retención de biomasa.

## 1.8 HIPÓTESIS

Es posible tener un bicultivo estable de *B. sphaericus* y de *M. mazei* que produzca metano a partir de acetamida.

*B. sphaericus* hidrolizará la acetamida a acetato más amonio y junto con *Methanosarcina* consumirán el acetato produciendo biomasa y metano.

Sus constantes específicas de velocidades de reacción y sus constantes de saturación permitirán que haya un equilibrio adecuado de las poblaciones en función del sustrato disponible.



## 2

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

En este capítulo se describen los materiales y métodos que fueron utilizados a lo largo de toda la tesis poniendo especial énfasis en la determinación de la acetamida y en sus productos de degradación tales como el acetato y la biomasa.

Las pruebas realizadas para la identificación de la especie de *Bacillus* estuvieron basadas en las técnicas más comunes de identificación y los parámetros seleccionados (T, pH, resistencia de las endosporas, presencia de enzimas como catalasa y citocromo oxidasa, morfología, Gram, capacidad metabólica, entre otros) se hicieron con base en las características del género reportadas en la literatura consultada (Buchanan y Gibbons, 1974; Krieg, 1981). El primer parámetro a medir fue la temperatura. Los resultados presentados son el promedio de triplicados después de una segunda reinoculación con el fin de descartar el error que se presentara en el crecimiento en la primera inoculación debido a una cantidad residual de sustrato proveniente del inóculo.

## 2.1 MICROORGANISMOS

**2.1.1 Bacteria aerobia.** Se utilizó una cepa de *Bacillus sphaericus* que se aisló de un reactor anaerobio (UASB) y se propagó en medio de Balch *et al.* (1979), con acetamida como fuente de carbono y se conservó en glicerol al 30% a -80 °C.

**2.1.2 Bacterias anaerobias.** Se utilizaron dos cepas de bacterias metanógenas *Methanosarcina barkeri* y *Methanosarcina mazei* de la colección DSM (1538 y 2953 respectivamente). Las características de estas dos cepas han sido reportadas por Holt *et al.* (1994) y García (1990). La selección de estas dos cepas se hizo debido a que su crecimiento se presenta en forma de gránulos o quistes, característica que las hace resistentes a concentraciones mínimas de oxígeno y porque pertenecen a un género que utiliza el acetato como fuente de carbono y energía, además de que este género fue aislado en el lodo de un reactor anaerobio (UASB) alimentado con acetamida.

## 2.2 MEDIO DE CULTIVO

Para todos los estudios realizados en el trabajo de esta tesis se utilizó como medio de base el medio de cultivo de Balch *et al.* (1979), esterilizado a 15 psig durante 15 minutos. La composición del medio se presenta en la Tabla 2.1

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo (Balch *et al.*, 1979)

Solución mineral 1	50 mL
Solución mineral 2	50 mL
Solución de oligoelementos	10 mL
Solución de vitaminas	10 mL
Solución de cloruro de níquel	10 mL
Solución de sulfato ferroso	1 mL
Extracto de levadura	0.1 g
Peptona de caseína	0.1 g
Acetamida	0.6 g
Agua destilada c.b.p.	1,000 mL

**Solución mineral 1** (g/L):  $K_2HPO_4$  6.0.

**Solución mineral 2** (g/L):  $KH_2PO_4$  6.0;  $(NH_4)_2SO_4$  6.0; NaCl 12.0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.6;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.16.

**Solución de oligoelementos:** Disolver 1.5 g de ácido nitrilotriacético en 950 mL de agua destilada y ajustar el pH a 6.5 con KOH diluido, adicionar (g):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  3.0;  $MnSO_4 \cdot 2H_2O$  0.5; NaCl 1.0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1;  $CoSO_4$  ó  $CoCl_2$  0.1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1;  $ZnSO_4$  0.1;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.01;  $AlK(SO_4)_2$  0.01;  $H_3BO_3$  0.01;  $Na_2MoO_4 \cdot 4H_2O$  0.01.

**Solución de vitaminas** (mg/L): biotina 2.0; ácido fólico 2.0; piridoxina 10.0; tiamina 5.0; riboflavina 5.0; D.L. ácido pantoténico 5.0;  $B_{12}$  0.1; ácido *p*-amino benzoico 5.0; ácido lipoico 5.0.

**Solución de cloruro de níquel** (g/L): 0.5.

**Solución de sulfato ferroso** (g/L): 2.0

### 2.3 PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS

Las tres cepas fueron propagadas y cultivadas con medio de Balch *et al.* (1979); en tubos Hungate (1969) con extracto de levadura y peptona de caseína, incubadas a 35 °C y pH 7.0.

Para el cultivo de las bacterias metanógenas el medio de base fue calentado a ebullición bajo una corriente de nitrógeno, usando cisteína y sulfuro de sodio a razón de 0.5 g/L y 0.25 g/L como agentes reductores para desplazar todo el oxígeno

disuelto en el medio, agregados después de enfriado el medio. Se utilizó acetato de sodio como fuente de carbono y energía a una concentración de 5 g/L, y extracto de levadura y peptona de caseína a una concentración de 1 g/L. La propagación se realizó hasta un volumen de 300 mL en botellas serológicas.

Para el cultivo de la bacteria aerobia el medio fue preparado sin reductores en matraces Erlenmeyer.

#### **2.4 ESTUDIO TAXONÓMICO Y FISIOLÓGICO DE *Bacillus* sp.**

Para los estudios taxonómicos y fisiológicos se utilizó el medio de cultivo descrito en la Tabla 2.1. Se añadieron 9 mL de medio de cultivo en tubos de ensaye de 20 mL, bien cerrados y esterilizados a 15 psi durante 15 min. La inoculación se realizó bajo condiciones asépticas con 1 mL de cultivo de *Bacillus* sp. en su fase exponencial de crecimiento (alrededor de 20-30 horas). Los cultivos fueron incubados y el crecimiento fue medido indirectamente como D.O. a 600 nm en un colorímetro Bausch & Lomb. Para todos estos estudios se realizaron dos transferencias de cultivo por triplicado cada una de ellas. Los intervalos empleados en los parámetros que se midieron estuvieron basados en los datos reportados para este género por Buchanan y Gibbons (1974), Krieg (1981), Holt *et al.* (1994).

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se midió de acuerdo a la ecuación de crecimiento exponencial ( $dx/dt = \mu x$ ), en cada uno de los estudios realizados.

#### **2.4.1 Efecto de la temperatura**

Para determinar la temperatura óptima de crecimiento de la cepa de *Bacillus* sp., los cultivos fueron incubados a 10, 20, 25, 28, 32, 35, 37, 40, 45 y 50 °C. El pH inicial del medio fue ajustado a 7.0 con bicarbonato de sodio. La incubación se llevó a cabo durante 72 h y se midió el crecimiento a diferentes intervalos de tiempo.

#### **2.4.2 Efecto de la concentración de extracto de levadura y peptona**

Dado que esta cepa crece solamente en presencia de estos dos componentes en el medio de cultivo, se decidió evaluar la concentración mas adecuada de la combinación de estos dos componentes para llevar a cabo una mejor hidrólisis de la acetamida y un mejor crecimiento. Para esto, se trabajó con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 g/L, (50% de cada uno) midiendo el crecimiento a diferentes intervalos de tiempo, con un pH inicial de 7.0 ajustado con bicarbonato y una temperatura de incubación de 37 °C.

#### **2.4.3 Tolerancia a la sal**

La importancia que presentan algunas especies halófilas de este género son las características de algunas de sus enzimas, las cuales presentan un alto valor comercial. La evaluación de este parámetro nos sirve para definir mejor la especie, por lo tanto, se decidió determinar el crecimiento de esta cepa con diferentes

concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). Las concentraciones probadas fueron: 0.5, 5, 12, 25, 50, 75 y 100 g/L. La incubación se llevó a cabo durante 72 h a 37 °C.

#### **2.4.4 Influencia del oxígeno**

Algunas especies de este género son aerobias estrictas y dado que esta cepa fue aislada de una muestra de lodos anaerobios era importante conocer las limitaciones que presenta esta cepa en cuanto a la concentración de oxígeno. Para este estudio se trabajó con oxígeno puro adicionado a la fase gaseosa de los cultivos (saturada de N<sub>2</sub>). Las concentraciones estudiadas se hicieron en un intervalo de 2.4, 4.7, 9, 13, 16.7, 20, 23, 33, 42.8 y 50%. Se determinó el crecimiento microbiano a diferentes intervalos de tiempo durante 72 h, a 37 °C y pH de 7.0. La linearización de los resultados se realizó por la ecuación propuesta por Owens y Legan (1987):

$$K_s/\mu_{\max} + S/\mu_{\max} = S/\mu$$

#### **2.4.5 Efecto del pH**

Para determinar el pH óptimo de esta cepa se trabajó en los intervalos de 4.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 9.0, utilizando una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% para ajustar a los pH correspondientes. El valor de pH final de los cultivos presentó una variación de 0.2 unidades. El tiempo de incubación fue de 72 h y la temperatura de 37 °C respectivamente.

**225704**

#### **2.4.6 Morfología**

Se inoculó en medio estéril. La incubación se llevó a cabo durante 72 h y se realizaron frotis a las 24, 48 y 72 h, tomando una asada del cultivo y secándola con calor, cuidando que la muestra no quedara muy densa. La tinción de Gram se realizó por la técnica de Bartholomew (1981). La observación de las muestras se hizo en un microscopio óptico (Olympus BH-2) con contraste de fases y objetivo de 100x.

El tamaño del bacilo se determinó en el mismo microscopio con un objetivo 100x graduado.

La cepa fue enviada al laboratorio de microscopía electrónica en la Universidad Aix-Marseille II, para describir la morfología y observar la presencia de flagelos.

#### **2.4.7 Termoestabilidad de las endosporas**

Esta determinación se realizó por calentamiento. La cepa fue inoculada en medio fresco y los cultivos se pusieron dentro de un baño de agua a 95 °C. a diferentes intervalos de 0, 10, 20 y 30 min. Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 72 h y se midió el crecimiento.

#### **2.4.8 Catalasa**

Para esta prueba se sembraron varias cajas de petri con la cepa de *Bacillus* sp. Se incubaron las cajas inoculadas a 37 °C durante 72 h. La determinación de la enzima

catalasa se realizó según la técnica de McFadin (1991). La prueba se realizó después de 24, 48 y 72 h de incubación adicionando a cada colonia 0.05 mL de una solución de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%. La formación de burbujas sobre las colonias demuestra la presencia de esta enzima.

#### **2.4.9 Citocromo-oxidasa**

La cepa se cultivó en un volumen de medio lo suficientemente grande para tener más de un gramo en base seca de biomasa. Después de la inoculación durante la fase exponencial de crecimiento, el cultivo se centrifuga a 5,000 rpm, durante 40 min a 5 °C. Se retira el sobrenadante y se lava el residuo con 100 mL de una solución amortiguadora de hidroximetilaminometano 20 mM (Tris HCl), con un pH entre 7.0 y 7.5. Esta suspensión es sonicada, 5 veces durante 2 min cada vez a 0.5 ciclos. Después es centrifugada a 30,000 rpm, durante 45 min a 5°C con el fin de eliminar los residuos celulares. Se repite dos veces el lavado y la centrifugación. El sobrenadante es entonces ultracentrifugado a 140,000 rpm, durante dos horas a 5 °C. Después de la ultracentrifugación se corre un espectro de absorción de 200 a 800 nm en cada una de las dos fracciones obtenidas: la fracción citoplasmática contenida dentro del sobrenadante y la fracción membrana contenida dentro del residuo. Un espectro es obtenido por la diferencia de los espectros de cada una de las fracciones, el sobrenadante oxidado y el residuo reducido con una gota de ditionita de sodio (2.5%). El valor de la absorbancia obtenida por la diferencia de los

dos espectros da el tipo de citocromo presente en la célula (McFadin, 1991; modificada por el laboratorio de Microbiología Anaerobia-IRD en Marsella, Francia).

#### **2.4.10 Crecimiento a partir de diferentes sustratos**

El estudio de cada microorganismo es importante porque por medio de ello se puede conocer la capacidad que presenta cada especie en la degradación de diferentes compuestos. Los compuestos probados fueron azúcares, ácidos grasos volátiles, otros ácidos orgánicos, alcoholes, nitrilos, aminas, amidas, polisacáridos, proteínas, extracto de levadura, gelatina, pectina, celulosa, almidón, casaminoácido y algunos compuestos aromáticos. La mayoría de los compuestos fueron agregados a una concentración de 20 mM, excepto para gelatina, almidón, pectina y celulosa que fue de 5 g/L. La celulosa, pectina, almidón y gelatina fueron esterilizados en tubos de ensaye sin el medio de cultivo para evitar la hidrólisis. Después de la esterilización se le adicionó a cada tubo 10 mL de medio estéril para posteriormente hacer la inoculación. El crecimiento fue medido durante 7 días, a pH 7.0 y 37 °C, utilizando un control, el cuál consistió en el medio de cultivo sin fuente de carbono y un blanco para calibrar el equipo que consistió en el medio base con sustrato sin inóculo. La diferencia de la absorbancia máxima entre el control y los sustratos nos indican los compuestos que pueden ser utilizados por esta bacteria como fuente de carbono y energía.

#### 2.4.11 Pruebas bioquímicas por galerías API

La galería API 50 CH permite realizar el estudio del metabolismo de carbohidratos de los microorganismos. Está compuesta por 50 microtubos con medio API, cada microtubo tiene una zona de anaerobiosis (tubo) para los estudios de fermentación y una zona de aerobiosis (cúpula), para los estudios de oxidación y asimilación.

El primer tubo sin principio activo, sirve como un control negativo. Los tubos restantes contienen cada uno cantidades definidas de sustrato, perteneciente a la familia de los carbohidratos y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos orgánicos).

Estos sustratos pueden ser metabolizados por diferentes vías:

- Asimilación; se traduce en un crecimiento del microorganismo en la cúpula, cuando el sustrato es utilizado como única fuente de carbono.
- Oxidación; se traduce en un cambio de color en la cúpula, debido a una producción de ácido en aerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio elegido.
- Fermentación; se traduce por un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácidos en anaerobiosis.

El medio empleado para la inoculación de estas galerías debe ser elegido en función del metabolismo a estudiar, y de las exigencias del grupo microbiano correspondiente. El medio utilizado para el género *Bacillus* fue el API CHB # 50430.

Los resultados obtenidos son procesados en una Tabla por medio de un programa de computadora, el cual contiene toda la información de las especies del género microbiano. La especie se determina en función de las características de las especies reportadas. Esta prueba se hizo durante mi estancia en el Laboratorio de Biotecnología de IRD (Montpellier, Francia).

#### **2.4.12 Filogenética**

Los ARN ribosómicos son moléculas persistentes que se encuentran en todos los organismos y sirven como excelentes cronómetros evolutivos. La comparación de las secuencias de las bases de los ARN ribosómicos se puede utilizar para determinar las interrelaciones entre los organismos. Actualmente, los árboles filogenéticos basados en el ARN ribosómico han sido preparados para todos los grupos procarióticos y eucarióticos importantes.

La taxonomía molecular incluye estudios diseñados para mostrar en forma directa o indirecta que las secuencias de bases ADN de dos organismos diferentes son semejantes o idénticas.

En la actualidad se dispone de procedimientos para determinar las secuencias de los nucleótidos de segmentos relativamente pequeños de ácidos nucleicos, tanto de ARN como de ADN. El intento más complejo de emplear la determinación de secuencia del nucleótido en la taxonomía bacteriana es el que incluye la secuenciación de ARN 16S, aislado de los ribosomas de varias especies bacterianas. El ARN 16S ribosomal consta de 1,500 nucleótidos, pero puede

romperse en fragmentos de 1 a 15 bases de longitud empleando enzimas que atacan el ARN. Por secuenciación de los cortos segmentos de nucleótidos puede establecerse un “catálogo” de secuencias para el ARN 16S de cualquier especie en particular. Con técnicas estadísticas es posible comparar dos secuencias “catálogos” y determinar el grado de semejanza entre dos especies (una misma especie está dada por un coeficiente con valor de 1, mientras que dos especies no relacionadas tendrán similitudes de coeficientes de 0.1).

La determinación de ARNr, 16S ribosomal que indica la proporción de guanina-citosina se hace extrayendo el ADN de la célula mezclando con desoxiribonucleótidos marcados con  $^{32}\text{P}$  y con la enzima transcriptasa y un cebador de ADN. A partir de los resultados se obtiene la secuencia. Esta determinación se hizo durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología Anaerobia del IRD (Marsella, Francia).

## **2.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS Y RENDIMIENTO CELULAR DE *Methanosarcina mazei*.**

En la literatura se presentan pocos datos cinéticos de *M. mazei* a diferencia de *M. barkeri*, por lo que se decidió determinar sus constantes de afinidad ( $K_s$ ), la velocidad máxima de producción de metano ( $V_{\max}$ ) y su rendimiento celular ( $Y$ ), bajo condiciones de cultivo anaerobio, utilizando acetato como fuente de carbono. Este estudio se hizo para saber si era posible realizar un bicultivo de esta cepa con la bacteria aerobia en la degradación de acetamida. Se midió la cinética de producción

de metano en frascos serológicos. Se usó medio mineral de Balch con 0.1g/L de extracto de levadura y peptona de caseína y diferentes concentraciones de acetato (2.4, 4.7, 12, 16, 24 mmol/L). La determinación de las constantes se hizo a partir de las velocidades iniciales de formación de metano que presentaron una curva típica de Monod. Posteriormente los datos fueron linearizados por la ecuación de Lineweaver-Burk. La determinación del rendimiento celular se realizó por la técnica de peso seco y DQO.

## **2.6 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETAMIDA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO POR *M. mazei*.**

Se evaluó la producción de metano a partir de acetato bajo condiciones anaerobias de la cepa de *M. mazei* con el propósito de saber si la acetamida causaba algún tipo de inhibición en la metanogénesis. La cinética se llevó a cabo en botellas serológicas de forma similar a lo descrito en la sección 2.5, con 15 mmol/L de acetato y diferentes concentraciones de acetamida (0, 10, 15, 20 y 50 mmol/L). Las velocidades iniciales de formación de metano fueron obtenidas a partir de las pendientes en cada una de las cinéticas.

## **2.7 BICULTIVOS EN LOTE**

Se llevaron a cabo varios cultivos en lote con *M. barkeri* y *B. sphaericus* y con *M. mazei* y *B. sphaericus* con el objeto de seleccionar solamente una cepa de las bacterias metanógenas para el arranque y operación de un reactor en continuo. Los cultivos se realizaron sin agitación en botellas serológicas de 60 mL con 20 mL de

medio con acetamida como fuente de carbono a una concentración inicial de 10 mM. El medio de cultivo se preparó en condiciones anaerobias, hirviendo el medio bajo una corriente de nitrógeno, sin adicionar reductores y adicionando el oxígeno puro en la fase gaseosa de la botella, (4.7, 9 y 13% V/V). La proporción de inóculo fue de 2 mL de *B. sphaericus* + 2 mL de *Methanosarcina* en fase exponencial de crecimiento. Otra cinética se realizó en el mismo medio de cultivo sin hervir, desplazando el aire de la fase vacía por nitrógeno y modificando la concentración de oxígeno disuelto variando la proporción de inóculo de *Methanosarcina* (5, 10 y 15 mL) y dejando fija la cantidad de *Bacillus* (2 mL), ajustando el volumen final (22 mL) con medio sin reducir. Todos los cultivos fueron incubados a una temperatura de 35 °C y pH de 7.0.

## **2.8 ANÁLISIS**

**2.8.1 La acetamida** fue determinada en un cromatógrafo VARIAN 3400 Cx, con un detector de ionización de flama (FID), con sistema de inyección Split-Splitless, una columna capilar AT-1000 de 0.25 mm de diámetro interno y 25 m de longitud, con temperatura programada de 120 a 180 °C, a razón de 10 °C/min con una temperatura del inyector de 200 °C, y 220 °C para el detector y utilizando helio como gas acarreador con un flujo de 3 mL/min.

**2.8.2 El acetato** se determinó en un cromatógrafo de gases HP- 5890, con detector FID con una columna capilar (AT-1000) de 0.53 mm por 10 m de longitud, con temperatura isotérmica de 130 °C, con una temperatura del inyector de 200 °C, y 220 °C para el detector y nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 4 mL/min.

**2.8.3 El oxígeno** en la fase gaseosa fue determinado con un cromatógrafo de gases GOW-MAC 550, con detector de conductividad térmica y una columna empacada con carbosphere 80/100. La medición se hizo en condiciones ambientales tanto para la columna como para el detector y el inyector, usando helio como gas acarreador a razón de 20 mL /min y una corriente en el filamento de 120 mA. El oxígeno disuelto fue medido directamente por medio de un electrodo de oxígeno marca JENWAY 9300.

**2.8.4 El metano** se determinó por cromatografía de gases en el mismo cromatógrafo que para la determinación de oxígeno; pero cambiando las condiciones de operación a una temperatura de columna de 140 °C, temperatura del inyector 170 y detector 190 °C y el flujo del gas acarreador a 30 mL /min y con una corriente de 120 mA.

Estos compuestos fueron cuantificados por medio de una curva estándar y los resultados registrados en un programa de computadora para el caso de acetamida y en un integrador Shimadzu C-R3A para el acetato, el oxígeno gaseoso y el metano.

**2.8.5 La biomasa** fue determinada por medio de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un colorímetro Bausch & Lomb Spectronic 20. La cuantificación en mg/L se hizo de acuerdo a una curva patrón de absorbancia contra peso seco en diferentes intervalos de la etapa exponencial de crecimiento de *B. sphaericus*.

## 2.9 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Para la determinación de acetamida se tomó 1 mL del cultivo, se adicionó 50 µL de ácido fórmico grado reactivo, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El

sobrenadante fue separado del residuo y congelado hasta su posterior determinación cromatográfica.

Para el acetato se tomó 1 mL del cultivo, se le adicionó 50  $\mu$ L de ácido clorhídrico al 50% (V/V) y se centrifugó a 13,000 RPM durante 15 min. El sobrenadante fue congelado hasta su posterior determinación. La acidificación se hizo con HCl dado que el ácido fórmico presenta el mismo tiempo de retención que el acetato.

Las muestras para las determinaciones de oxígeno y metano eran tomadas bajo condiciones de asepsia con jeringas de insulina, purgando la jeringa con nitrógeno para evitar la entrada de aire en los cultivos al tomar las muestras. Para la medición se tomaron 0.1 mL y se inyectaron directamente al cromatógrafo.

Para la medición de biomasa fue tomada una alícuota de 5 mL en un tubo de ensaye y medida su absorbancia directamente en el fotocolorímetro a 600 nm.

### 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En el inciso 3.1 de este capítulo se estudia la fisiología y se determinan las características de una cepa de *Bacillus sphaericus*, aislada del lodo de un reactor UASB que transforma acetamida en acetato. Los resultados muestran que *B. sphaericus* puede crecer en bicultivo con bacterias metanógenas debido a que presenta condiciones fisiológicas de cultivo muy similares a estas bacterias.

En el inciso 3.2 de este capítulo se estudia la cinética de degradación de acetamida por *Bacillus sphaericus* en un reactor continuo con acumulación de biomasa. Para determinar los parámetros cinéticos ( $K_s$ ,  $\mu_{max}$ ) y el rendimiento celular ( $Y$ ), se siguió un modelo de reacciones en serie (Acetamida  $\rightarrow$  acetato  $\rightarrow$  biomasa). Los resultados muestran que *B. sphaericus* puede hidrolizar acetamida en una reacción de orden  $1\frac{1}{2}$  global, dando una reacción de orden  $\frac{1}{2}$  para el sustrato y de orden 1 para la biomasa, sugiriendo que la velocidad está determinada tanto por las concentraciones de biomasa como por las de acetamida. Los parámetros de

crecimiento con acetato como fuente de carbono, bajo estas condiciones, fueron  $\mu_{\max} = 0.1\text{d}^{-1}$ ,  $K_s = 37\text{ mg/L}$ ,  $Y = 0.018\text{ gX/gAm}$ .

En el inciso 3.3 de este capítulo se estudia la producción de metano a partir de acetamida por un bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en reactores intermitentes y en un reactor continuo con retención de biomasa en presencia de oxígeno. Los resultados de los reactores intermitentes muestran que la acetamida es hidrolizada a las 24 horas, mientras que la producción de metano tiene una fase de retardo de 3 o más días, debido a un efecto tóxico del oxígeno en las cepas de *Methanosarcina*. En el reactor en continuo con oxígeno el bicultivo presenta una hidrólisis de la acetamida del 40%, independientemente de la carga aplicada, sin embargo, la eficiencia de remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) si depende de la carga volumétrica aplicada, obteniéndose valores entre el 13 y 30% para cargas entre 1.5 y 3 g/L·d.

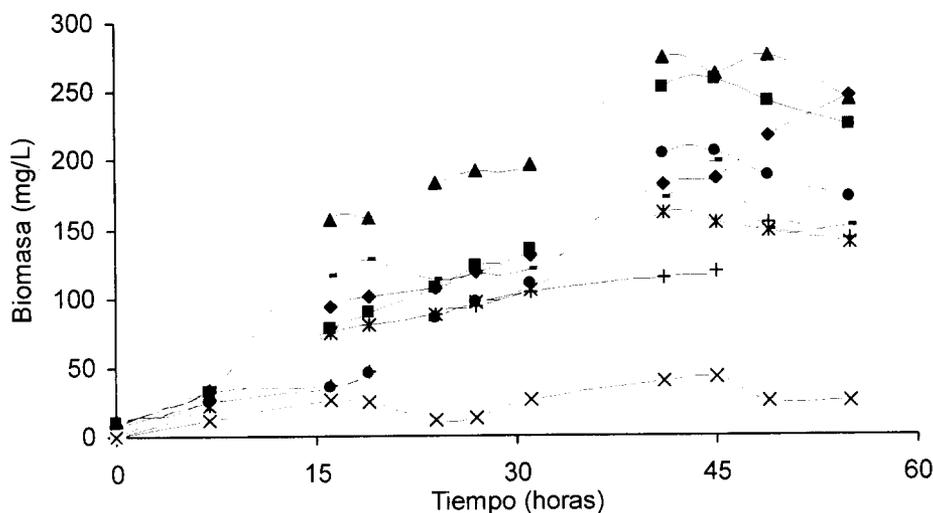
La producción de metano no fue significativa debida a que el acetato producido de la hidrólisis de acetamida fue consumido rápidamente por *B. sphaericus*, quedando muy poco acetato disponible para la metanogénesis.

### **3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA DE *Bacillus sphaericus***

#### **3.1.1 Efecto de la temperatura**

La Figura 3.1 muestra el crecimiento de *Bacillus* sp. a las diferentes temperaturas estudiadas y se observa que el mayor crecimiento se presenta a los 32 °C. La Figura 3.2 presenta la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp. en función de la

temperatura. Como se puede observar, el cultivo presenta crecimiento entre los 20 y 40 °C y su máxima velocidad específica de crecimiento se presenta entre a los 37 °C. La habilidad de las especies de este género de crecer en un amplio rango de temperaturas ha sido reportada por Mortimer *et al.* (1981) y Norris (1981), aunque la mayoría de las especies reportadas son mesófilas.



**Figura 3.1 Crecimiento de *Bacillus* sp. a diferentes temperaturas, utilizando medio de Balch con 10 mM de acetamida y pH 7. (+), 20 °C; (●), 25 °C; (■), 28 °C; (▲), 32 °C; (◆), 35 °C; (-) 37 °C; (\*), 40 °C; (x), 45 °C.**

Graficando el "ln" de la velocidad específica de crecimiento contra el inverso de la temperatura (Figura 3.3) se obtuvo la energía de activación ( $E_a$ ) por medio de la ecuación de Arrhenius ( $K = Ae^{-E/RT}$ ). El valor que se obtiene es de 12,006 cal/mol, este valor confirma que *Bacillus* sp, es una bacteria mesofílica. El intervalo de diferentes valores de energía de activación de las bacterias mesófilas está entre 10,000 a 14,000 cal/mol (Quintero, 1980; Pirt, 1985).

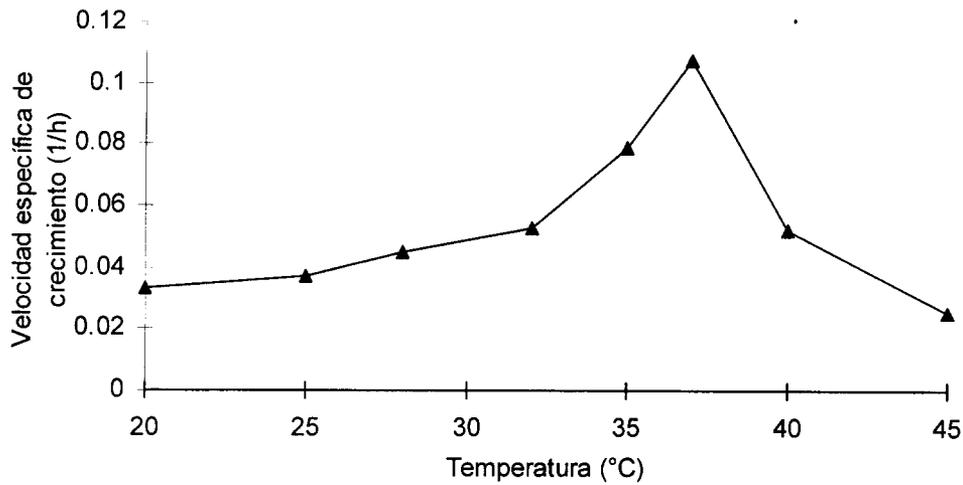


Figura 3.2 Influencia de la temperatura en la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp.

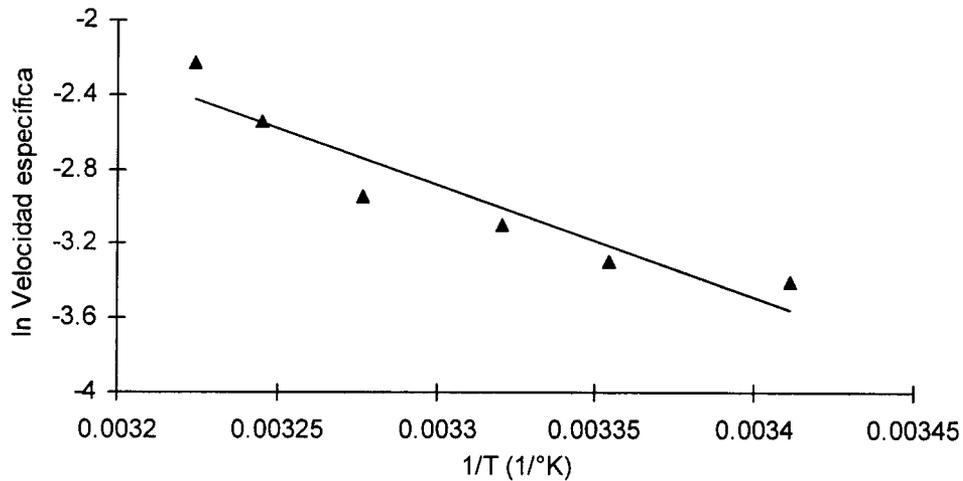


Figura 3.3 Obtención de la energía de activación para *Bacillus* sp. por medio de la ecuación de Arrhenius.

### 3.1.2 Efecto de la concentración de extracto de levadura y peptona

Un estudio anterior en el cual *Bacillus* sp. no presentó crecimiento con el medio de Balch sin extracto de levadura y peptona demostró que la presencia de estos dos componentes en el medio de cultivo aportan algún componente esencial para que

*Bacillus* sp. pueda desarrollarse. La Figura 3.4 presenta el crecimiento de *Bacillus* sp. con las diferentes concentraciones de extracto de levadura y peptona de caseína estudiadas. Se puede observar que a mayor concentración de extracto de levadura y peptona, mayor es el crecimiento.

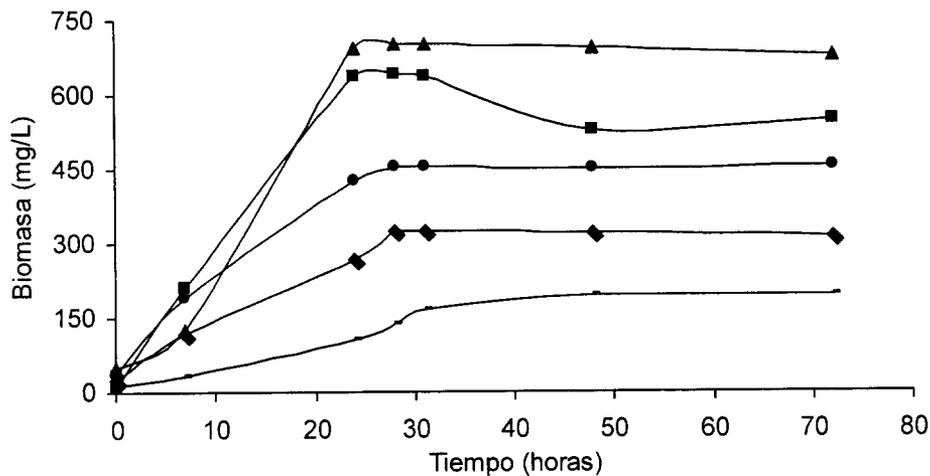
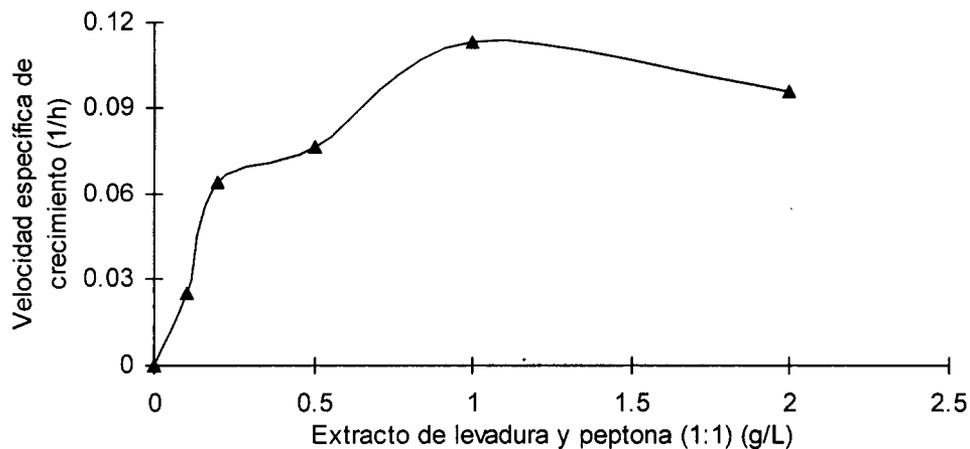
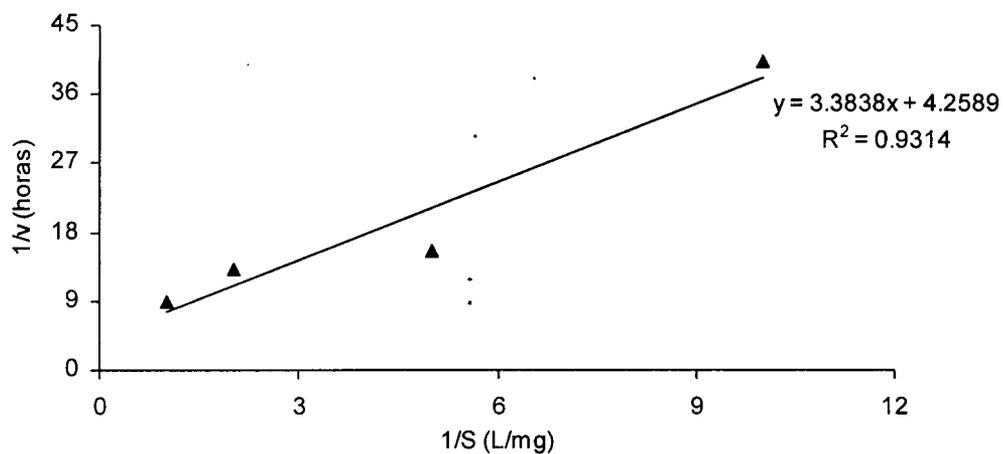


Figura 3.4 Crecimiento de *Bacillus* sp. en medio de Balch con 10 mM de acetamida y diferentes concentraciones de extracto de levadura y peptona de caseína y pH 7. (—), 0.1 g/L; (◆), 0.2 g/L; (●), 0.5 g/L; (■), 1 g/L; (▲), 2 g/L.

La Figura 3.5 muestra que la mezcla de los dos compuestos limita la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp. Linearizando los datos por la ecuación de Lineweaver-Burk ( $1/v_0 = (K_m/V_{max}) 1/S + 1/V_{max}$ ), con una regresión de 0.93 se obtuvo una  $K_s$  de 0.79 g/L, una  $\mu_{max}$  de  $0.23 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación ( $t_g$ ) de 3 horas.



**Figura 3.5** Influencia de la concentración de extracto de levadura y peptona de caseína en la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp.



**Figura 3.6** Obtención de  $K_s$  y  $\mu_{max}$  por medio de la ecuación de Lineweaver-Burk.  
 $\mu_{max} = 0.23 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 0.79 \text{ g/L}$ .

La diversidad del género *Bacillus* en sus requerimientos nutricionales es importante, algunas especies necesitan compuestos complejos tales como ácido úrico y alantoico para desarrollarse (Gordon *et al.*, 1973). Algunas especies de este género son auxótrofas a la biotina y a la tiamina, dos componentes que se encuentran tanto en el extracto de levadura como en la peptona (Ordúz *et al.*, 1993). Las necesidades

de peptona que presentan algunas especies está relacionada con su forma de esporulación (Gordon *et al.*, 1973).

### 3.1.3 Tolerancia a la salinidad

La Figura 3.7 presenta el crecimiento de *Bacillus* sp. con las diferentes concentraciones de sal estudiadas. Se observa que el crecimiento es muy similar entre los 0.5 y 25 g/L. Por arriba de una concentración de 25 g/L se presenta inhibición en el crecimiento, lo cual indica que se trata de una especie no halotolerante.

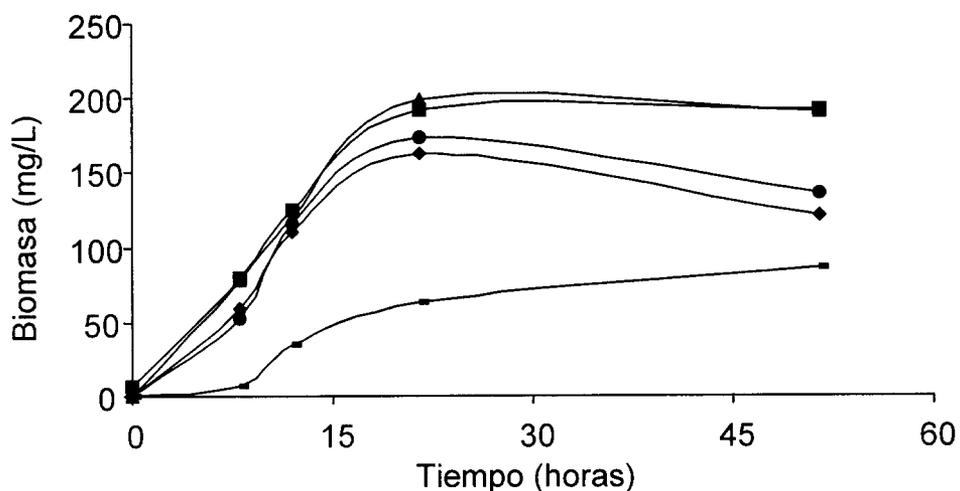


Figura 3.7 Crecimiento de *Bacillus* sp. en medio de cultivo de Balch, con diferentes concentraciones de NaCl y pH 7. (■), 0.5 g/L; (▲), 5 g/L; (●), 12 g/L; (◆), 25 g/L; (-), 50 g/L.

En la Figura 3.8 se observa que la concentración a la cual se reduce la velocidad de crecimiento en un 50% ( $RI_{50}$ ) es de 60 g/L. La mayor velocidad específica de crecimiento se presentó entre 0.5 y 12 g/L (concentración isotónica) con un valor de  $0.114 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  y un  $t_g$  de 6 horas, este valor es mayor que el presentado a diferentes

concentraciones de extracto de levadura y peptona seguramente porque tanto el extracto de levadura como la peptona de caseína son utilizadas por la cepa como fuente de carbono.

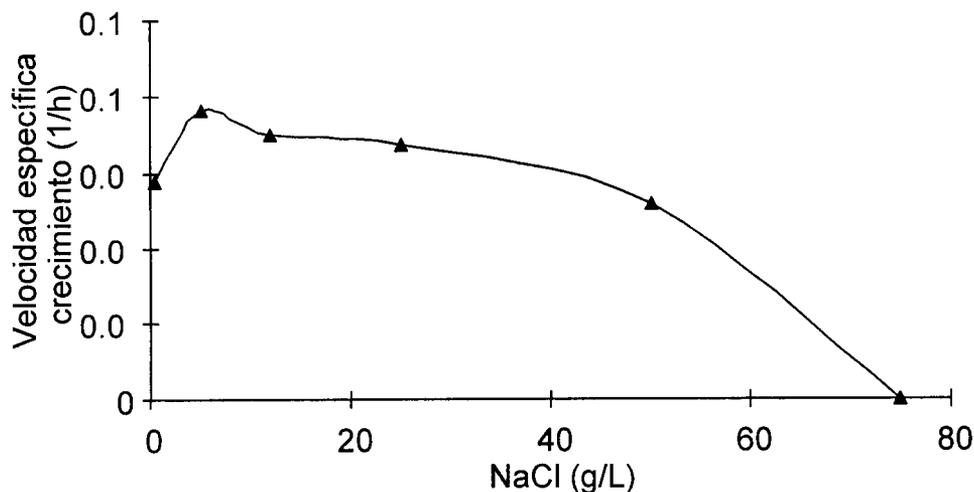
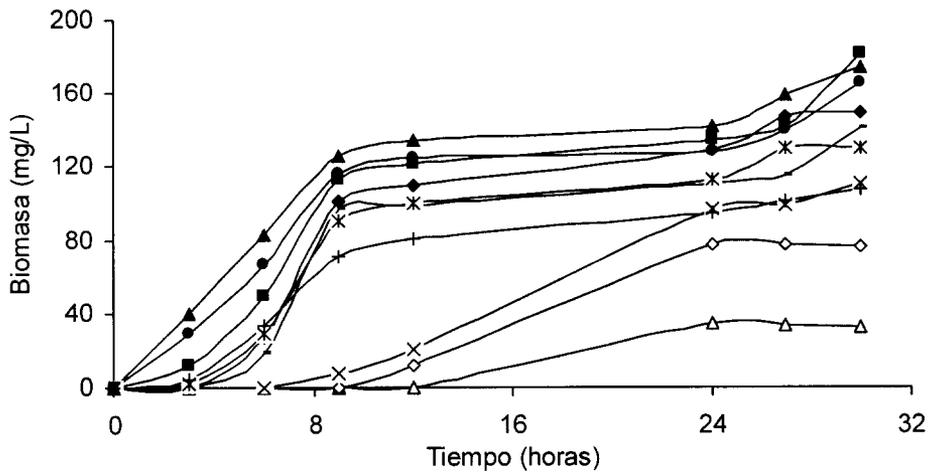


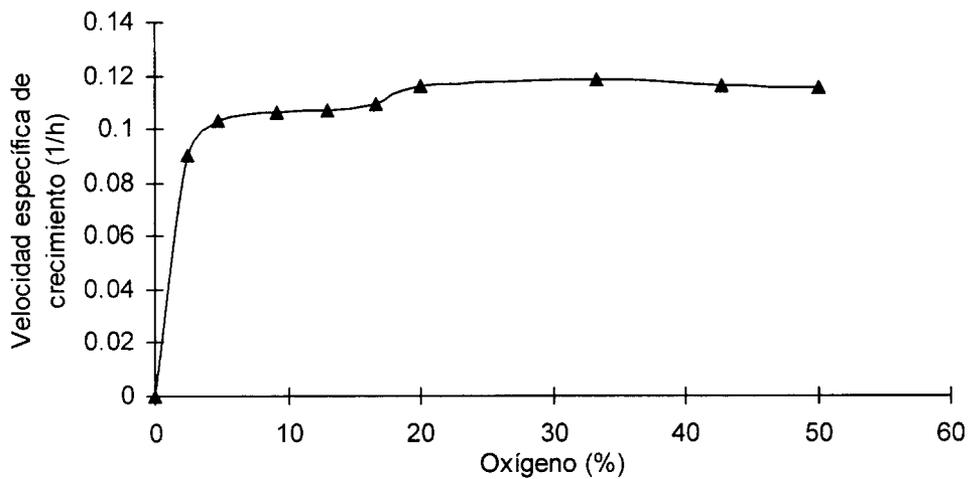
Figura 3.8 Influencia de la concentración de NaCl en la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp.

### 3.1.4 Influencia del oxígeno

La Figura 3.9 presenta el crecimiento de *Bacillus* sp. con las diferentes concentraciones de oxígeno estudiadas. Se observa que entre mayor es la concentración de oxígeno mayor es el crecimiento de *Bacillus* sp. La Figura 3.10 presenta la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), en un intervalo de 5 a 50% de oxígeno en la fase gaseosa (1.4 a 14.9 mgOD/L). Se observa que a partir del 9% (2.5 mgOD/L), la velocidad específica de crecimiento permanece constante. En condiciones anaerobias no se presentó crecimiento.



**Figura 3.9** Crecimiento de *Bacillus* sp. en medio de cultivo de Balch con diferentes concentraciones de oxígeno, 10 mM de acetamida y pH 7.  
 ( $\Delta$ ), 2.44%; ( $\square$ ), 4.8%; ( $\times$ ), 9%; ( $-$ ), 13 %; ( $\blacklozenge$ ), 16.7%; ( $*$ ), 20%;  
 ( $+$ ), 23%; ( $\blacksquare$ ), 33%; ( $\bullet$ ), 43%; ( $\blacktriangle$ ), 50%.



**Figura 3.10** Influencia de la concentración de oxígeno en la velocidad de crecimiento de *Bacillus* sp.

Los valores de  $K_s$  reportados por Atkinson y Mavituna (1991) para diferentes bacterias aerobias estrictas están en el rango de 0.00003 a 0.011 mg/L de oxígeno disuelto/L.

La linearización de estos datos (Figura 3.11) se realizó con una de las ecuaciones propuestas por Owens y Legan (1987):  $K_s/\mu_{max} + S/\mu_{max} = S/\mu$ , dado que resultó ser la mejor para el ajuste de los resultados de donde se obtuvo una  $\mu_{max}$  de  $0.12 \text{ (h}^{-1}\text{)}$  y una  $K_s$  de  $0.76\%$  de oxígeno en la fase gaseosa ( $0.22 \text{ mgOD/L}$ ), este valor tan alto de oxígeno disuelto pudo deberse a que la determinación del oxígeno disuelto no se hizo de forma directa sino a través de la medición por cromatografía del oxígeno gaseoso y utilizando la ley de Henry. Los resultados indican que *Bacillus sp.* es una bacteria aerobia estricta.

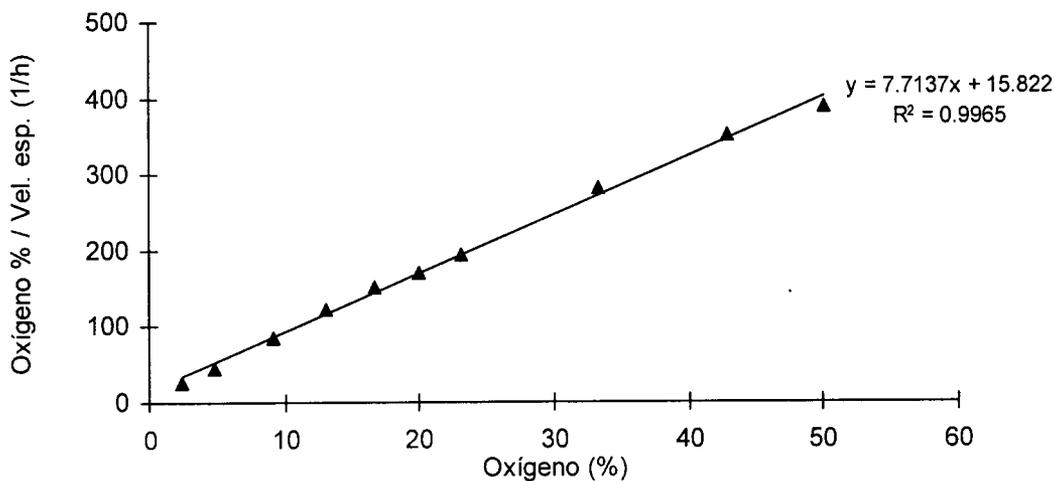
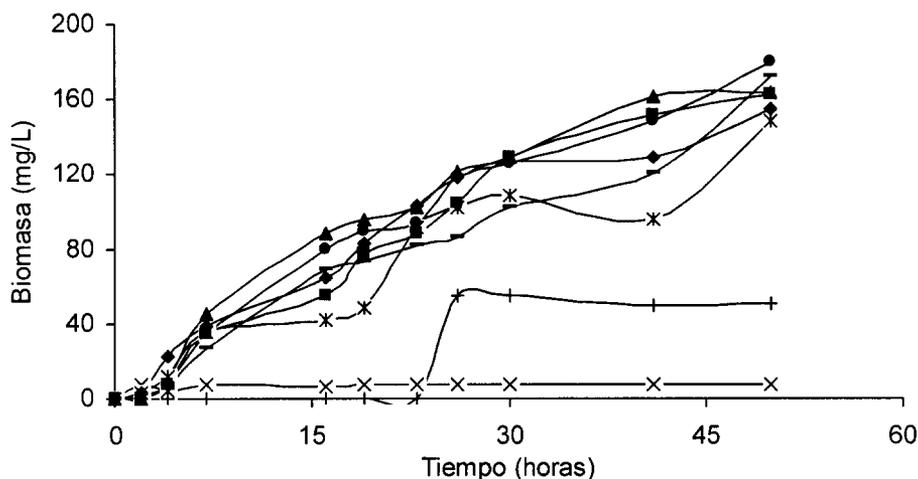


Figura 3.11 Obtención de  $K_s$  y  $\mu_{max}$  crecimiento de *Bacillus sp.* con diferentes concentraciones de oxígeno.  $\mu_{max} = 0.12 \text{ h}^{-1}$ ;  $K_s = 0.76 \%$ .

### 3.1.5 Efecto del pH

La Figura 3.12 presenta el crecimiento de *Bacillus sp.* con los diferentes pH estudiados. Como se observa la máxima producción de biomasa se presenta entre los valores de pH de 5.5 a 8.0. La Figura 3.13 presenta la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). La mayor velocidad de crecimiento se presenta a un pH de 7.0, con

un valor de  $0.21 \text{ h}^{-1}$ . El valor de  $\mu$  de este estudio es dos veces mayor que para los demás estudios realizados, debido probablemente a que en este caso el pH fue ajustado con carbonato de sodio habiendo una variación al final del experimento de 0.2 unidades, mientras que para los otros estudios anteriores se ajustó inicialmente a 7.0 con bicarbonato de sodio y el pH final llegó hasta 8.0 debido a la producción de amonio proveniente de la hidrólisis de la acetamida, lo que demuestra que para estas condiciones de cultivo fue mejor el carbonato de sodio.



**Figura 3.12** Crecimiento de *Bacillus sp.* en medio de cultivo de Balch con diferentes pH y con 10 mM de acetamida.  
 (x), 4; (\*), 5.5; (-), 6; (●), 6.5; (▲), 7.0; (■), 7.5; (◆), 8; (+), 9.

Mortimer *et al.* (1981) y Krieg (1981) reportan que el género *Bacillus* presenta una gran diversidad en su crecimiento con respecto al pH, pueden encontrarse cepas acidófilas (pH de 2-6), neutrófilas (6-8) o alcalófilas (mayor de 8). Por lo tanto, esta cepa forma parte de las bacterias neutrófilas.

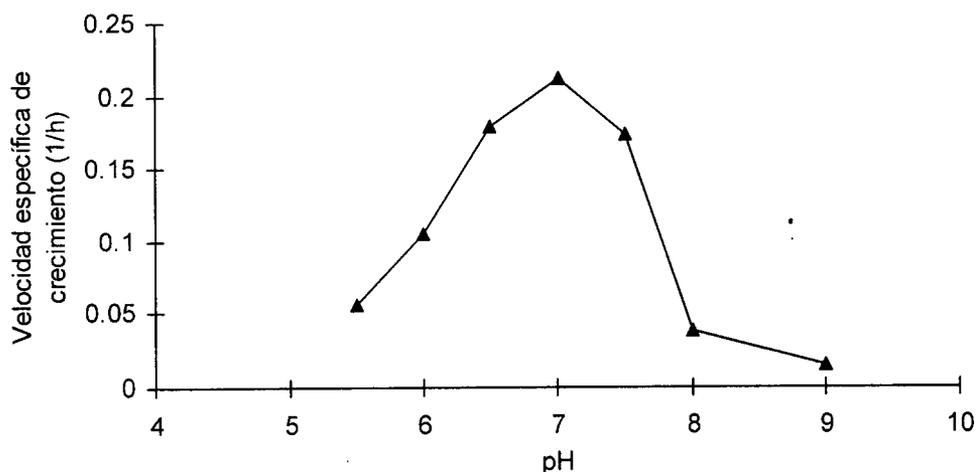


Figura 3.13 Influencia del pH en la velocidad específica de crecimiento de *Bacillus* sp.

### 3.1.6 Morfología

La Figura 3.14 muestra que el bacilo aislado corresponde a un bastón recto de 0.5-1.0 x 2.5-5  $\mu\text{m}$ . Presenta esporas redondas terminales y no más de una por célula como se esperaba para una bacteria perteneciente al género *Bacillus*.

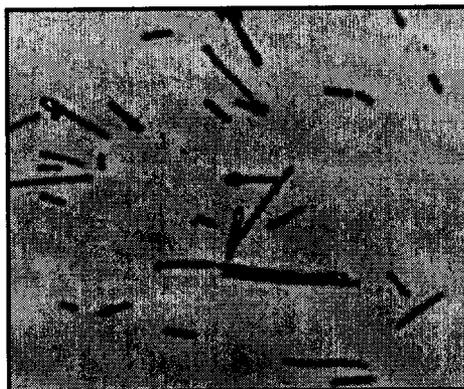
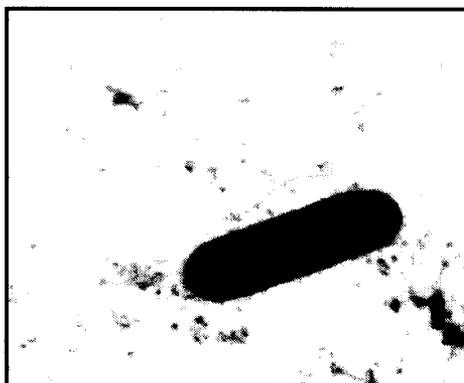


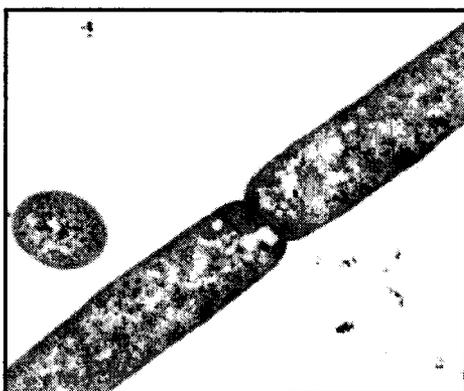
Figura 3.14 Células de *Bacillus* sp. observadas en microscopio óptico con contraste de fases (x100).

Una fotografía tomada por microscopía electrónica de barrido indica que este bacilo tiene flagelos peritricos (Figura 3.15).



**Figura 3.15** Microfotografía electrónica de una célula de *Bacillus* sp., donde se pueden observar los flagelos (x 9,000)

La Figura 3.16 muestra que dependiendo de la etapa de crecimiento y del medio de cultivo utilizado, esta cepa es capaz de formar cadenas de dos o más bacilos (Claus y Berkeley, 1986).



**Figura 3.16** Microfotografía electrónica de *Bacillus* sp. formando cadenas (x 35,000).

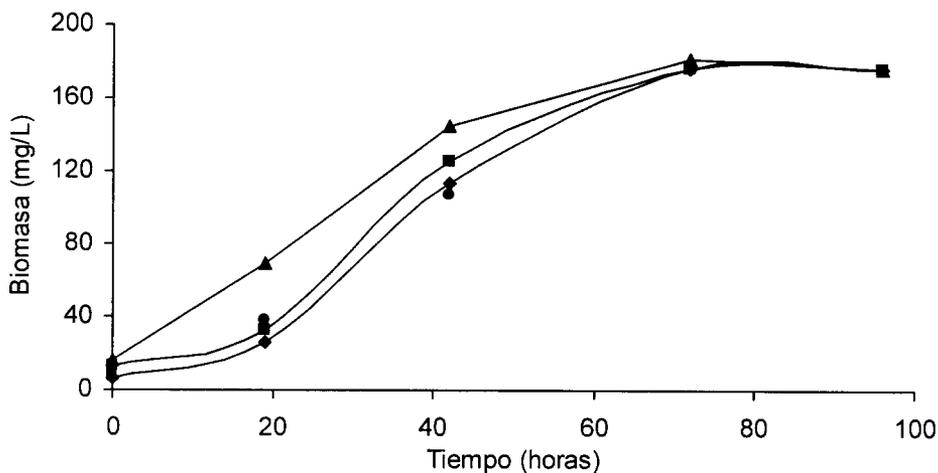
La morfología colonial de *Bacillus* sp. en un medio de cultivo sólido de Balch y utilizando acetamida como fuente de carbono corresponde a pequeñas colonias blancas, lisas y redondas, mientras que en un medio utilizando extracto de levadura

y peptona de caseína las colonias son mayores, de color crema, mucosas y las células se agrupan en cadena característica reportada para este género.

La reacción de Gram fue positiva en la etapa exponencial de crecimiento, mientras que en etapas finales del crecimiento es Gram variable. La mayoría de las especies de este género presentan reacciones de Gram variable dependiendo de la edad del cultivo (Claus y Berkeley, 1986).

### **3.1.7 Termoestabilidad de las endosporas**

El género *Bacillus* se caracteriza por la formación de endosporas y la tolerancia al calor que presentan las endosporas de cada una de las especies de este género las hace más o menos resistentes a otros cambios que se lleguen a presentar en los ambientes donde se desarrollan. La Figura 3.17 muestra los resultados del crecimiento de *Bacillus* sp. en medio de cultivo de Balch, pH de 7.0 y a diferentes tiempo de calentamiento a 95 °C. La estabilidad de las endosporas se determinó mediante la medición del crecimiento que presentó *Bacillus* sp. a diferentes tiempos de exposición al calor. Se observa que el perfil del crecimiento es muy similar para todos los tiempos de calentamiento alcanzando el máximo crecimiento a las 72 horas. Esto indica que las esporas de *Bacillus* sp. son resistentes a la temperatura.



**Figura 3.17** Crecimiento de *Bacillus sp.* en medio de Balch a pH 7, después de haber sido sometido a los diferentes tratamientos térmicos (95 °C). (▲), 0 minutos; (■), 10 minutos; (◆), 20 minutos; (●), 30 minutos.

### 3.1.8 Catalasa

La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias estrictas y facultativas que contienen citocromos. Usualmente todos los microorganismos que tienen algún sistema de citocromos contienen catalasa con excepción del género *Streptococcus spp.* (Holdeman *et al.*, 1977).

La presencia de burbujas en la superficie de cada una de las colonias formadas por *Bacillus sp.* fue positiva en las diferentes etapas de incubación, demostrando así que es una bacteria con catalasa positiva.

### 3.1.9 Citocromo oxidasa

Los sistemas de transporte de electrones consisten en una serie de acarreadores de electrones asociados a la membrana que funcionan en forma integrada para acarrear electrones desde la fuente de energía a un aceptor externo como el

oxígeno. Los componentes clave del sistema de transporte de electrones son las flavoproteínas, las quinonas y los citocromos. Los citocromos son proteínas con anillos porfirínicos que contienen hierro. Pueden sufrir oxidación y reducción mediante la pérdida o ganancia de un electrón por el átomo de hierro en el centro del citocromo (Brock y Madigan, 1991). Los diferentes citocromos se designan por letras; a, b y c dependiendo de sus potenciales de reducción. La determinación de la enzima citocromo oxidasa es importante para la definición de una especie microbiana.

Los resultados obtenidos para la cepa de *Bacillus* sp. indicaron que la diferencia entre las absorbancias de las dos fracciones medidas; la oxidada y la reducida, fue de 0.22 a 423 nm, lo cual demostró la presencia de citocromo b.

#### **3.1.10 Crecimiento a partir de diferentes sustratos**

El género *Bacillus* comprende a una gran diversidad de microorganismos que dada sus características particulares suelen crecer en diversos compuestos utilizándolos como fuentes de carbono y energía. La diversidad de sustratos que puede utilizar este género es importante por lo que fue necesario utilizar numerosos compuestos (Tabla 3.1), la mayoría de ellos mencionados en la literatura (Buchanan y Gibbons, 1974; Krieg, 1981). La finalidad de utilizar compuestos tóxicos derivados de nitrilos y amidas se debió a que esta cepa fue aislada de un reactor que trataba un efluente con acetamida.

Tabla 3.1 Crecimiento de *Bacillus* sp. en diferentes compuestos. Medio de Balch con 0.1 g/L de extracto de levadura y peptona, pH de 7.0 y 37 °C.

Compuesto	Biomasa (mg/L)	Compuesto	Biomasa (mg/L)
Control (medio de cultivo sin sustrato)	44 ± 4.0		
<b>Alcoholes:</b>		<b>Acidos grasos volátiles:</b>	
Metanol	54 ± 1.3	Fórmico	26 ± 0.6
Etanol	46 ± 0.8	Acético	130 ± 7.9
Propanol	51 ± 1.3	Propiónico	35 ± 0.7
Butanol	52 ± 0.8	Butírico	32 ± 0.7
Adonitol	39 ± 0.8	Succínico	31 ± 0.3
Dulcitol	44 ± 0.9		
Etilenglicol	39 ± 1.2		
Glicerol	51 ± 1.3		
Manitol	39 ± 0.8		
<b>Ácidos orgánicos:</b>		<b>Aminas:</b>	
Láctico	38 ± 0.8	Metilamina	38 ± 0.7
Málico	37 ± 0.4	Etilamina	38 ± 1.1
Fumárico	32 ± 0.7	Trimetilamina	31 ± 0.3
Pirúvico	103 ± 8.0		
Succínico	35 ± 0.7		
<b>Nitrilos:</b>		<b>Amidas:</b>	
Acetonitrilo	44 ± 4.8	Acetamida	231 ± 17
Acilonitrilo	32 ± 1.8	Acrilamida	0 ± 0.0
Benzonitrilo	38 ± 0.8	Benzilcianida	0 ± 0.0
Crotonitrilo	32 ± 0.0	Propionamida	157 ± 11
Isobutironitrilo	38 ± 4.6	Isobutiramida	126 ± 2.1
Metacilonitrilo	38 ± 0.7	Metacrilamida	76 ± 3.8
Valeronitrilo	38 ± 0.7	Succinamida	51 ± 5.3
Succinonitrilo	38 ± 2.7		
<b>Aromáticos:</b>		<b>Azúcares:</b>	
Ac. Pimélico	00 ± 0.0	Trealosa	38 ± 1.1
Dibenzotiofeno	7 ± 0.0	Xilosa	39 ± 1.1
Ac. Tereftálico	0 ± 1.4	Sorbosa	37 ± 0.8
4-carboxibenzaldehido	26 ± 0.6	Arabinosa	38 ± 1.5
Ac. Adípico	38 ± 1.1	Celobiosa	37 ± 0.7
Ac. Benzoico	37 ± 0.8	Fructuosa	38 ± 1.1
Ac. p-toluico	32 ± 0.7	Galactosa	38 ± 1.5
		Glucosa	39 ± 1.1
		Lactosa	37 ± 0.7
		Maltosa	32 ± 0.3
		Manosa	32 ± 0.3
		Melobiosa	38 ± 1.1
		Ramnosa	37 ± 0.7
		Ribosa	32 ± 0.3
		Sacarosa	32 ± 0.4
<b>Polisacáridos:</b>		<b>Aminoácidos:</b>	
Almidón	53 ± 5.0	Casaminoácidos	153 ± 8.0
Pectina	40 ± 1.2		
Celulosa	38 ± 5.0		
<b>Proteínas:</b>		Extracto de levadura	341 ± 11
Betaina	51 ± 2.5		
Biotripticasa	210 ± 9.5		
Caseína	40 ± 1.2		
Gelatina	129 ± 7.9		

Como se puede ver, la capacidad metabólica de esta cepa no es muy amplia ya que su crecimiento está limitado a muy pocos compuestos entre ellos algunas amidas (acetamida, propionamida, isobutiramida y metacrilamida), acetato, piruvato, gelatina, biotripticasa, extracto de levadura y casaminoácidos.

Los azúcares, alcoholes, ácidos grasos volátiles (excepto el acetato), ácidos orgánicos (excepto el piruvato), compuestos aromáticos, aminas, nitrilos y polisacáridos no se consumen. Con los nitrilos la bacteria no presentó crecimiento probablemente porque estos compuestos suelen ser tóxicos debido a la presencia del grupo ciano en la molécula. Los números en negro corresponden a los compuestos consumidos. La biomasa obtenida para el caso del almidón resultó ser mucho mayor que la del control, por lo que se decidió realizar una actividad amilolítica dado que la bacteria no consume azúcares. Esta actividad resultó ser negativa.

Dado que es de interés la eliminación de amidas en aguas residuales industriales ya que pueden ocasionar daños a la salud se decidió cuantificar la degradación de las amidas por cromatografía de gases ya que disponía de la metodología para hacerlo. La Tabla 3.2 presenta el porcentaje de consumo para estas amidas.

Los resultados indican que la facilidad de utilizar estas amidas está en relación al número de carbonos que contenga la molécula, es decir entre menor peso molecular tenga el compuesto el crecimiento y el consumo son mayores esto pudo deberse a que la solubilidad límite en agua para las amidas es hasta de 5 carbonos (Morrison y Boyd, 1990).

**Tabla 3.2 Crecimiento de *Bacillus* sp. y porcentaje de degradación de las amidas utilizadas (20 mM).**

Nombre del compuesto	Biomasa (mg/L)	Desaparición del compuesto (%)	Estructura
Acetamida	231 ± 17	98	CH <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub>
Propionamida	157 ± 11	94	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> CONH <sub>2</sub>
Isobutiramida	126 ± 2.1	65.5	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> CONH <sub>2</sub>
Metacrilamida	76 ± 3.8	60.0	H <sub>2</sub> C=C(CH <sub>3</sub> )CONH <sub>2</sub>
Control (inoculo sin amida)	44 ± 4	-	-

La prueba con nitrilos y amidas se realizó ya que hasta la fecha no hay información de que el género *Bacillus* utilice estos compuestos.

Resultados presentados por Mohamed *et al.* (1989) sobre una cepa de *Pseudomonas putida*, a un pH de 7.0 y 25 °C, demuestran que esta bacteria es capaz de utilizar además de 12 nitrilos las mismas amidas utilizadas por *Bacillus* sp., presentándose un comportamiento similar en la degradación de éstas.

### 3.1.11 Pruebas bioquímicas por Galerías API

Esta prueba se realizó, dado que la mayoría de las especies reportadas de *Bacillus* consumen carbohidratos.

De los 49 carbohidratos estudiados, solamente se presentaron resultados positivos para el microtubo conteniendo n-acetil glucosamina, los 48 microtubos restantes fueron negativos. Estos resultados confirman lo obtenido en la prueba de sustratos, en donde *Bacillus* sp. no presenta crecimiento en azúcares (Tabla 3.1). También fue negativo el uso del almidón.

Estos resultados fueron procesados en un programa de computadora que incluye el paquete de las galerías API para comparar las características obtenidas de la cepa en estudio con perfiles tipo de varias especies reportadas de *Bacillus*. Los resultados obtenidos presentaron un porcentaje de similitud del 99% con *Bacillus sphaericus*.

La Tabla 3.3 resume las características más importantes obtenidas para la cepa de *Bacillus* sp. y las características reportadas para una cepa de *Bacillus sphaericus*. Si se comparan estos resultados con los reportados en la literatura (Tabla 1.1), se puede ver que muy pocas especies no consumen carbohidratos (*B. badius*, *B. insolitus*, *B. schlegelii* y *B. sphaericus*). Sin embargo, se reportan otras características diferentes para las otras tres especies reportadas, tales como la reducción de nitrato, el crecimiento en medio anaerobio, hidrólisis de caseína, pH, esporangios, esporas, temperatura y sustratos.

### **3.1.12 Filogenética**

Para confirmar la especie de la cepa en estudio fue necesario determinar el porcentaje de guanina-citosina por medio del estudio taxonómico, *Bacillus* sp. presentó un valor del 37% de G+C.

**Tabla 3.3 Características más importantes de la cepa en estudio y una cepa de *Bacillus sphaericus*.**

Características	<i>Bacillus sphaericus</i> (este estudio)	<i>Bacillus sphaericus</i> (Claus y Beckley, 1986)
Morfología	Bastones rectos (a veces formando cadenas de dos o más)	Bastones rectos (a veces formando cadenas)
Dimensiones	Diámetro de 0.5-1.0 x 1-2.5 $\mu\text{m}$	Diámetro menor de 1.0 $\mu\text{m}$
Gram	Positivo en cultivos jóvenes	Positivo o negativo
Motilidad	Positivo debido a flagelos peritricos	Positiva por flagelos
Endosporas	Redondas terminales resistentes al calentamiento después de 30 minutos	Redondas muy resistentes
pH	Crecimiento de 5 a 8.5, mejor a pH de 7.0	5-9
Temperatura	Crecimiento de 20-40 °C, mejor a 37 °C	10-40 °C
NaCl	Crecimiento de 0.5-5%	Menor del 10%
Oxígeno	Crecimiento de 1.4-14 mg/L, mejor a partir de 6 mg/L con una $K_s = 0.22$ mg/L	Aerobio estricto
Extracto de levadura y Peptona de caseína	Crecimiento de 0.1 a 2.0 g/L; mejor a 2.0 g/L, con una $K_s$ de 0.79 g/L	Positivo
Crecimiento en Anaerobiosis	Negativo	Negativo
Compuestos utilizados	Acetato, biotripticasa, casaminoacido, extracto de levadura, piruvato, gelatina	similares
Amidas	Acetamida, propionamida, isobutiramida, metacrilamida y succinamida	No reportado
Catalasa	Positiva	Positiva
Hidrólisis de almidón	Negativo	Negativo
Utilización de azúcares	Negativo	Negativo
Citocromo oxidasa	Positiva, citocromo b	Positiva
G-C %	37	34-40

### 3.1.13 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la cepa corresponde a una bacteria aerobia estricta, en forma de bastones rectos con endosporas redondas terminales, motilidad positiva debido a flagelos peritricos, con requerimientos nutricionales complejos, mesófila, neutrófila, capaz de utilizar acetato, piruvato, proteínas, acetamida y otras amidas alifáticas, pero que no consume carbohidratos y no hidroliza almidón. Las pruebas con galerías API y el estudio filogenético presentaron un 99% de similitud con *Bacillus sphaericus*.

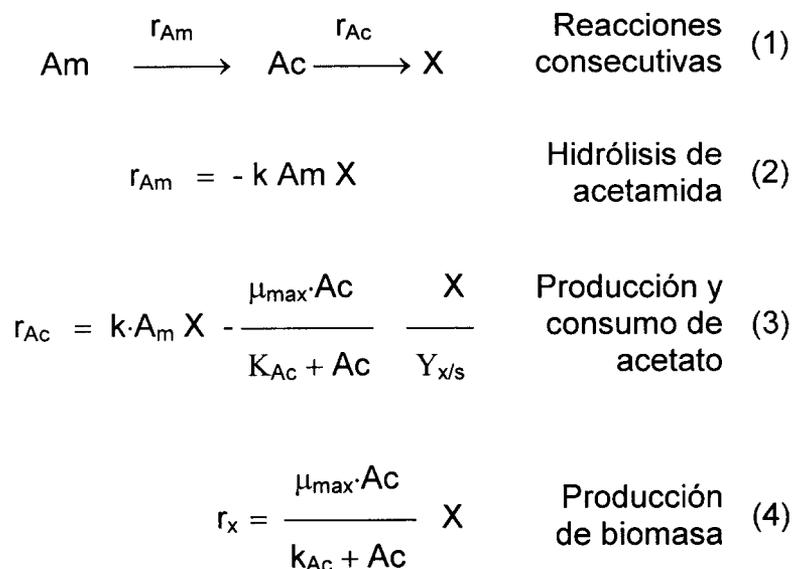
Debido a que sus condiciones fisiológicas pH, T y requerimientos nutricionales complejos son similares a la de las bacterias metanógenas, excepto por su necesidad de oxígeno, es posible operar un bicultivo de *B. sphaericus* con bacterias metanógenas.

## 3.2. DEGRADACIÓN DE ACETAMIDA POR *Bacillus sphaericus* EN UN REACTOR CONTINUO CON RETENCION DE BIOMASA

### 3.2.1 Introducción

En base a las observaciones de Guyot *et al.* (1994; 1995) se propuso un modelo cinético de degradación de acetamida que se muestra en la Tabla 3.4. La ecuación 1 muestra que es una reacción consecutiva en donde la acetamida es hidrolizada a ácido acético y éste a su vez es consumido por *B. sphaericus* para su crecimiento.

**Tabla 3.4 Ecuaciones cinéticas para la degradación de acetamida, producción de acetato y producción de biomasa de *B. sphaericus*.**



Am = Concentración de acetamida; Ac = Concentración de acetato;  $r_{Am}$  = Velocidad de hidrólisis de acetamida;  $r_{Ac}$  = Velocidad de consumo de acetato; X = Biomasa; k = Constante de reacción de 2° orden;  $k_{Ac}$  = Constante de afinidad para el acetato;  $\mu_{max}$  = Velocidad específica de crecimiento máxima; Y = Rendimiento celular

**Tabla 3.5 Balances de materia en el cultivo continuo de *B. sphaericus* en un reactor con retención de biomasa.**

$$\frac{dAm}{dt} = D(\text{Am}_o - \text{Am}) - K_{Am}X \quad (5)$$

$$\frac{dAc}{dt} = -D\text{Ac} + k_{Am}X - \frac{\mu_m \cdot \text{Ac}}{K_{Ac} + \text{Ac}} \frac{\text{X}}{Y_{X/S}} \quad (6)$$

$$\frac{dX}{dt} = -DX_1 + \mu X \quad (7)$$

Am = Concentración de acetamida; Ac = Concentración de acetato; k = constante de reacción de 2° orden; X = Concentración de biomasa; D = Tasa de dilución; X1 = Concentración de biomasa a la salida del reactor.

La hidrólisis de acetamida (Ecuación 2) es representada por una reacción de orden 2 global en donde las concentraciones de biomasa y de acetamida son de primer orden parcial.

La velocidad de acumulación de acetato (Ecuación 3), es una función de la hidrólisis de acetamida y del consumo de acetato por *B. sphaericus* (Ecuación 4).

Los balances de acetamida, de acetato y de biomasa en el reactor se muestran en la Tabla 3.5.

### **3.2.2 Diseño experimental**

**3.2.2.1 Reactor continuo.** El reactor empleado para este estudio (Figura 3.18), consiste de una columna de vidrio. Tiene una chaqueta de vidrio en las paredes del reactor que sirve para mantener constante la temperatura. En la parte superior tiene una campana que separa el efluente de los sólidos y el gas. En la parte superior de la campana se encuentra una salida para recolectar y medir el biogás producido. El efluente se derrama por la parte superior del reactor y sale por la parte inferior de la campana. El medio de cultivo estéril se alimenta por la parte inferior a través de una bomba peristáltica y en la parte inferior del reactor se tiene un filtro de vidrio sinterizado con el fin de retener la biomasa.

El reactor tuvo un volumen de operación de 0.8 L y fue operado a 35 °C. La inoculación se llevó a cabo con 60 mg de *Bacillus sphaericus*. La composición de medio de alimentación consistió en el medio de Balch *et al*, (1979), descrito en el capítulo 2, con 0.1 g/L de extracto de levadura, 0.1 g/L de peptona de caseína y

acetamida como fuente de carbono y la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue de 6.4 mg/L. El oxígeno disuelto en la alimentación se midió cada vez que se preparaba medio fresco, presentándose una desviación estándar no mayor al 10%. El medio no fue saturado ni se burbujeó oxígeno al reactor para mantener las condiciones de los reactores anaerobios.

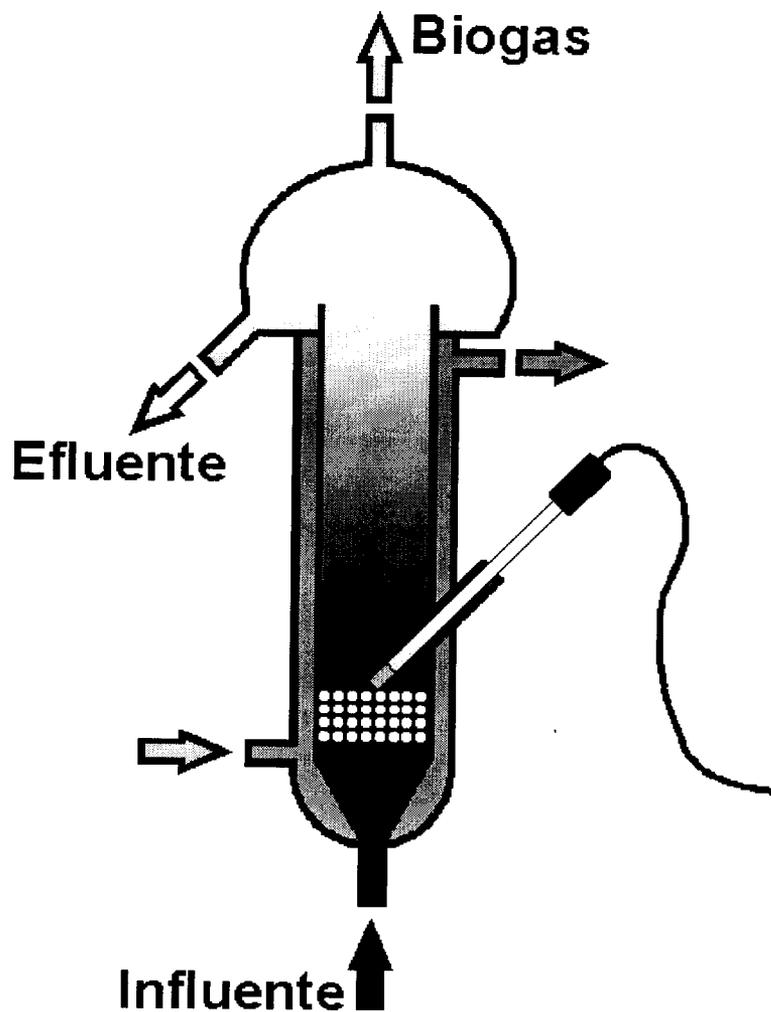


Figura 3.18 Reactor continuo con retención de biomasa (RCRB).

Las concentraciones de acetamida y los tiempos de residencia hidráulica (TRH) fueron variados de acuerdo al diseño experimental presentado en la Tabla 3.6 Los cambios en los TRH y las concentraciones en la alimentación se hicieron de acuerdo al diseño propuesto por Guyot *et al.*, 1995. El pH del medio fue ajustado a 7.0 y esterilizado a 15 lb/plg<sup>2</sup> durante 15 min, y el cambio de medio se hacía todos los días.

**Tabla 3.6 Diseño experimental para el crecimiento de *B. sphaericus* en cultivo continuo.**

<b>Am<sub>o</sub> (mg/L)</b>	1,000	1,500	2,000	3,000	3,000	3,000	3,000
<b>TRH (días)</b>	1	1	1	1	2	3	0.5
<b>Bv (g<sub>Am</sub>/L·d)</b>	1	1.5	2	3	1.5	1	6

Am<sub>o</sub> = Concentración inicial de acetamida; TRH = tiempo de residencia hidráulica;  
Bv = carga volumétrica.

La determinación de biomasa dentro del reactor se realizó por medio de la absorbancia a 600 nm, tomando del lecho del reactor y con agitación una alícuota (5 mL) en condiciones estériles.

La concentración de oxígeno disuelto se midió por medio de un oxímetro en el efluente, debido a problemas en la medición directa en el lecho. La concentración de oxígeno en la salida fue siempre de cero.

**3.2.2.2 Determinación de las constantes cinéticas de *B. sphaericus*.** La constante de afinidad ( $K_s$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y la constante de rendimiento ( $Y$ ), fue determinada con las ecuaciones cinéticas y el balance de masa descritos en las Tablas 3.4 y 3.5 La acetamida hidrolizada es

modelado como una ecuación de 2<sup>o</sup> orden (Ecuación 2), en la cual el acetato es un producto intermediario (Ecuaciones 3 y 6). El crecimiento de la biomasa fue determinado por la ecuación de Monod (Ecuación 4 y 7).

### 3.2.3 Resultados y discusión

La Figura 3.19 muestra las concentraciones de acetamida, acetato residual (3.19a) y de biomasa (3.19b) al alimentar distintas concentraciones de acetamida al reactor. La biomasa de salida fue muy irregular y con valores despreciables (menores a 10 mg/L), debido a que la agitación que se pudo presentar dentro del reactor fue debida únicamente a la velocidad de flujo y a pequeñas burbujas de aire que pudieron introducirse cada vez que se cambiaba el medio de alimentación.

Se puede apreciar que una vez que la biomasa se empieza acumular no se detecta acetato a la salida y la velocidad de consumo de acetamida va en aumento.

Cuando se aumenta la concentración de acetamida y se baja la carga por un aumento en el TRH la hidrólisis de acetamida presenta una alta eficiencia, sin embargo, la acumulación del acetato es muy baja indicando que aun en estas condiciones *B. sphaericus* es capaz de consumir todo el acetato para su crecimiento dejando muy poco sustrato para la metanogénesis. Cuando se disminuye el TRH a 0.5 días ocurre un lavado de las células debido a un aumento en la carga de acetamida.

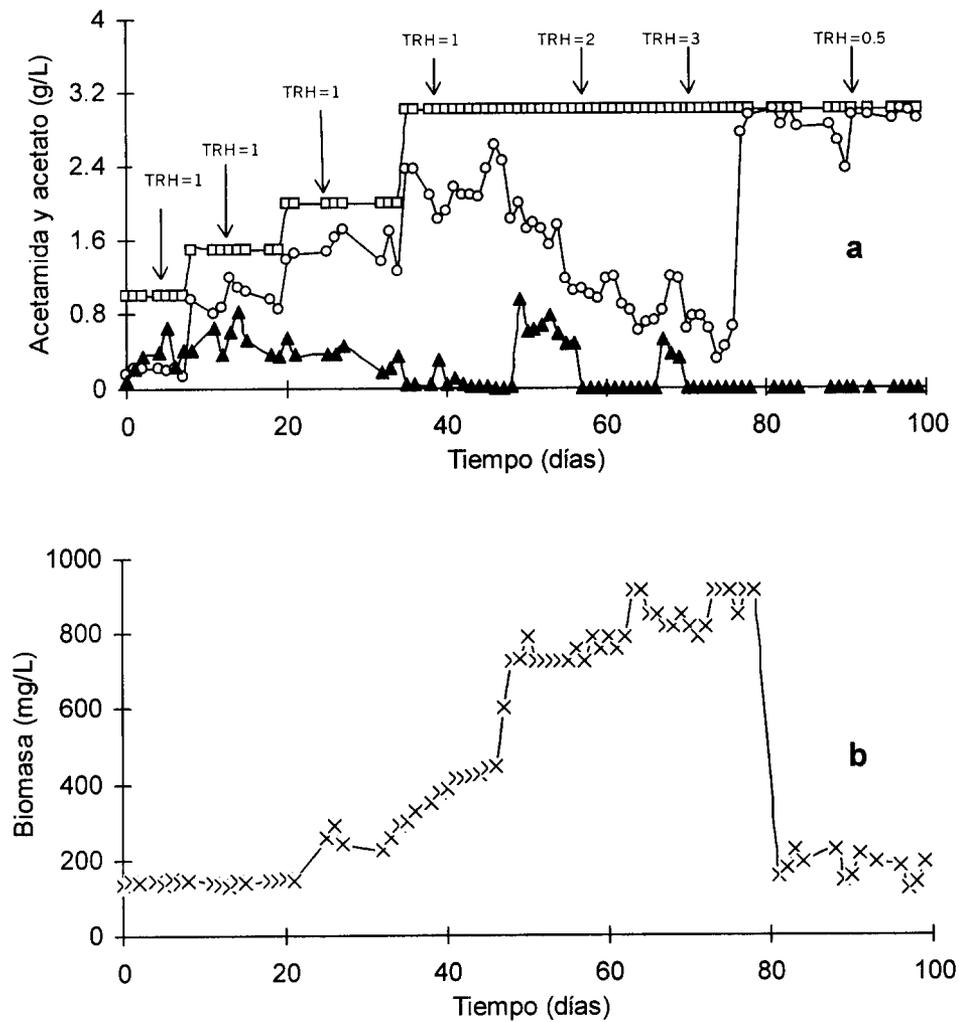


Figura 3.19 Cultivo continuo de *B. sphaericus* en un reactor RCRB expuesto a diferentes cargas. a) concentración de sustrato y productos; b) Acumulación de biomasa. (□), Amo; (O), Am; (▲), Ac; (x), células.

Los valores pseudoestacionarios respecto a la biomasa, acetamida y acetato se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Resultados de la hidrólisis de acetamida por *B. sphaericus* en cultivo continuo.

t (días)	D (d <sup>-1</sup> )	Am <sub>0</sub> (mg/L)	Am (mg/L)	Ac (mg/L)	X (mg/L)	OD (mg <sub>OD</sub> /L·d)	B <sub>OD</sub> (mg <sub>OD</sub> /g <sub>Am</sub> ·d)
0-8	1	1000	120	536	157	6.4	6.4
8-19	1	1500	840	354	163	6.4	4.3
19-34	1	2000	1260	31.2	288	6.4	3.2
34-41	1	3000	2160	0	413	6.4	2.1
41-62	0.5	3000	1710	0	788	3.2	4.3
62-75	0.33	3000	660	0	913	2.1	6.4
75-98	2	3000	2868	0	207	12.8	1.0

t, tiempo de estado estacionario; D, tasa de dilución; Am<sub>0</sub>, concentración de acetamida inicial; Am, concentración de acetamida en el efluente; Ac, concentración de acetato; X, biomasa dentro del reactor; OD, oxígeno disuelto; B<sub>OD</sub>, carga de oxígeno disuelto.

Con estos valores se obtienen las constantes cinéticas de la ecuación 5 de la Tabla 3.5. De la reacción de hidrólisis de acetamida (reacción 2 de la Tabla 3.4), se obtiene k. En estado estacionario:

$$D(A_{mo} - A_m) = kA_m^{\delta} X$$

$$A_{mo} - A_m = kA_m \frac{X}{D}$$

$$\frac{D}{X}(A_{mo} - A_m) = kA_m^{0.5}$$

Donde se observa que la ecuación de hidrólisis es de orden 1½ y no de 2 como se había planteado. El cálculo de esta constante se muestra en la Figura 3.20.

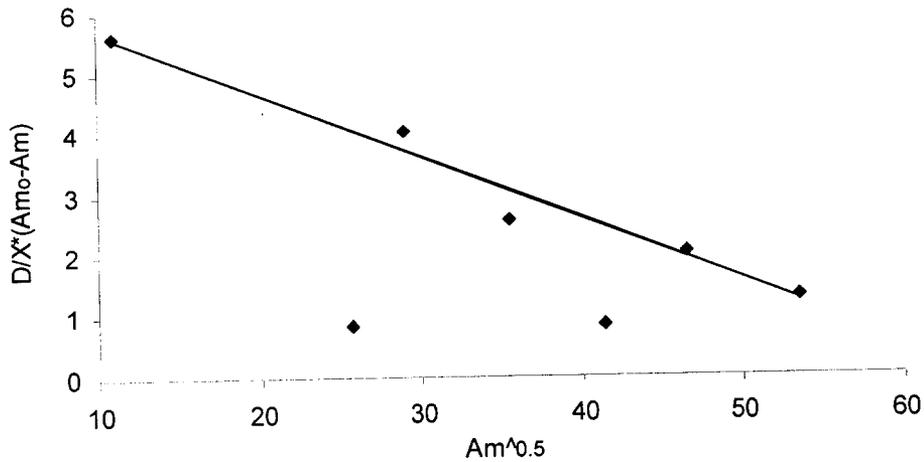


Figura 3.20 Obtención de k a partir de la reacción de hidrólisis de acetamida.  $k = 0.103 \text{ (L/g)}^{0.5} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Tomando el intervalo de 35 a 48 días de la Figura 3.19b, que es cuando se presenta la mayor retención de la biomasa, se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) y la constante de afinidad ( $K_s$ ) a partir de las ecuaciones 4 y 7 de la Tabla 3.5, graficando  $Ac$  contra  $Ac/\mu$  como se muestra en la Figura 3.21. Los valores de estas constantes fueron de  $0.102 \text{ d}^{-1}$  y  $37 \text{ mg/L}$  respectivamente.

$$\frac{1}{X} dX = \mu dt \quad \mu = \frac{1}{\Delta t_1} \frac{\ln X_i}{X_{i-1}}$$

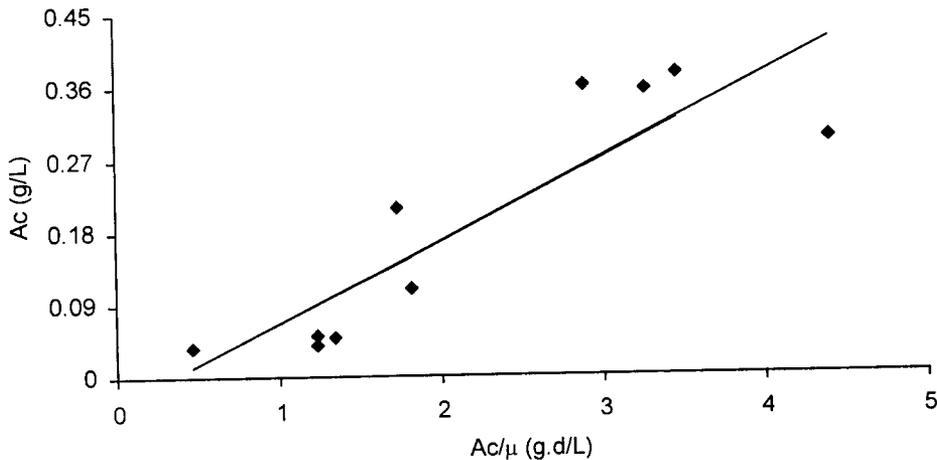
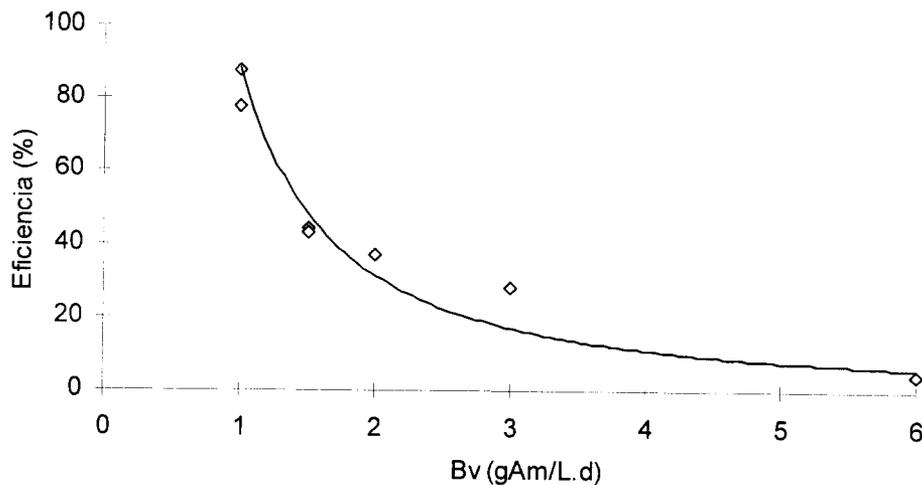


Figura 3.21 Obtención de las constantes  $\mu_{\max}$  y  $K_s$  de *B. sphaericus* en continuo, donde  $K_s = 37 \text{ mgAc/L}$ ;  $\mu_{\max} = 0.102 \text{ d}^{-1}$ .

El rendimiento celular  $Y$  fue calculado por la ecuación  $Y = dx/dt$  a partir del intervalo donde la biomasa presentó su mayor retención. Según la Tabla 3.7 se tiene que para este periodo la concentración de sustrato a la entrada es de 3,000 mg/L y el sustrato residual fue de 1,710 mg/L y el incremento en la biomasa fue de 913-288 mg/L, entonces el rendimiento de *B. sphaericus* fue de 0.484 g<sub>cel</sub>/g<sub>Ac</sub>.

La velocidad de consumo de acetato fue calculada por la ecuación  $Q_{x/s} = \mu_{max}/Y$ , resultando ser de 0.21 g<sub>Ac</sub>/g<sub>cel</sub>·d.

Si se grafica la eficiencia de hidrólisis de acetamida en función de la carga volumétrica (Figura 3.22), se observa que la eficiencia disminuye con el aumento de la carga orgánica volumétrica y de la carga específica (Figura 3.23).



**Figura 3.22** Eficiencia de hidrólisis de acetamida como una función de la carga volumétrica de acetamida (Bv) (gAm/L.d).

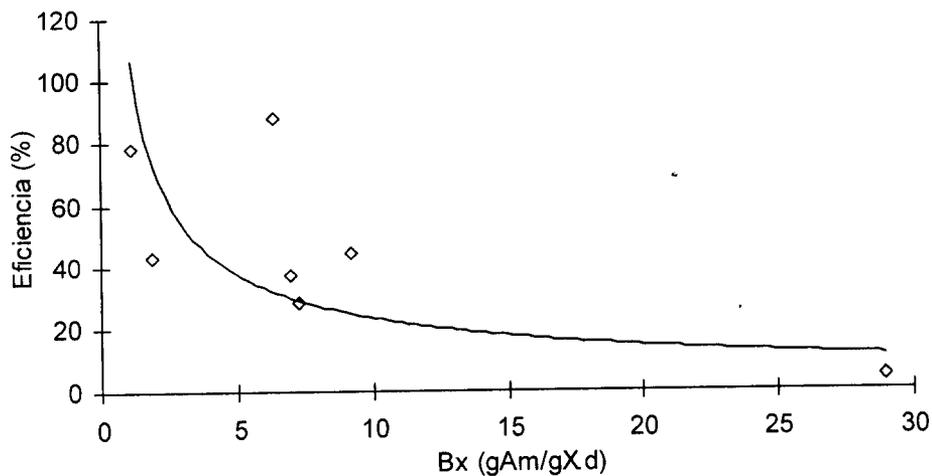


Figura 3.23 Eficiencia de hidrólisis como una función de la carga específica de acetamida.

Este comportamiento sugiere una inhibición por sustrato o una saturación en el sistema debido a la baja cantidad de biomasa producida, ocasionada por la baja concentración de oxígeno, tal como lo muestra la Figura 3.24.

Guyot *et al.* (1995), reportaron una inhibición en un reactor anaerobio con lodos con altas cargas de acetamida.

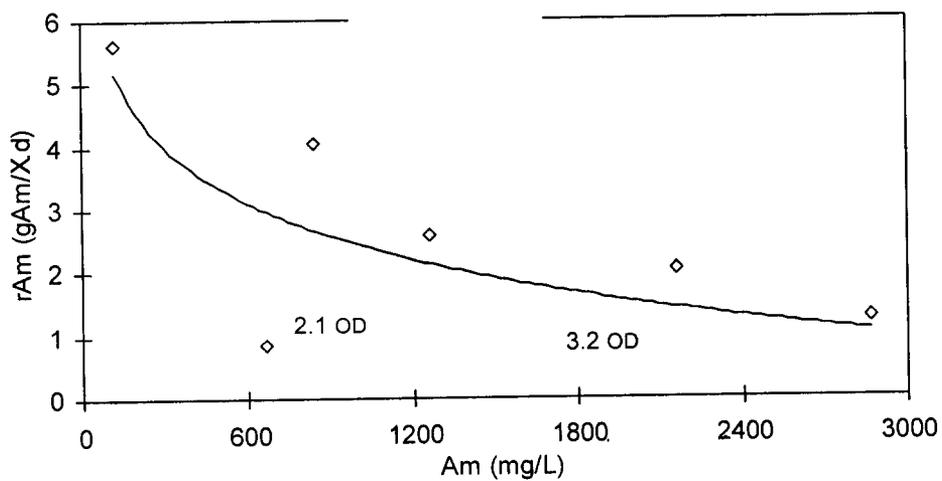
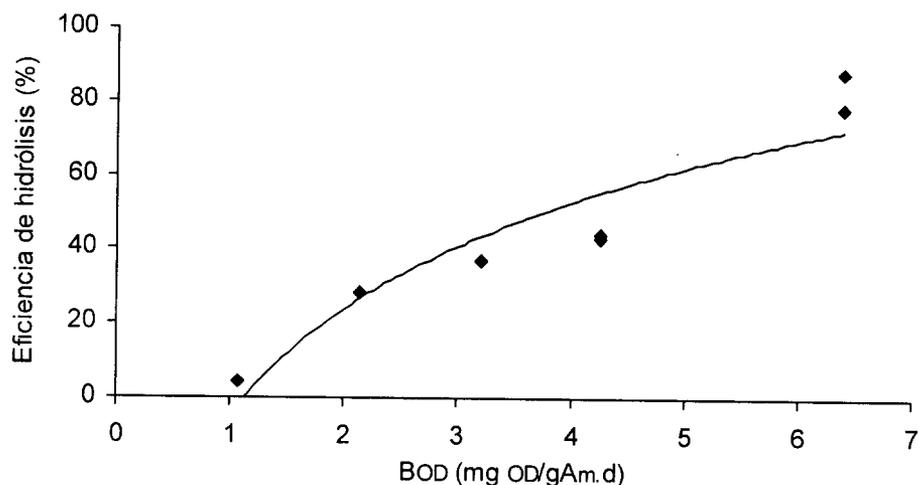


Figura 3.24 Tasa específica de hidrólisis de acetamida, como una función de la concentración de acetamida.

Las Figuras 3.25, muestra una influencia positiva de la disponibilidad de oxígeno sobre la eficiencia de hidrólisis de acetamida, indicando que se necesita mas oxígeno en el medio para lograr una mayor eficiencia de hidrólisis.



**Figura 3.25 Influencia del oxígeno en función de la eficiencia de hidrólisis de acetamida.**

La Figura 3.26 muestra la tasa específica de consumo de acetato como una función de la carga de oxígeno ( $B_{Ox}$ ), donde se ve que el consumo de acetato es independiente de la carga de oxígeno.

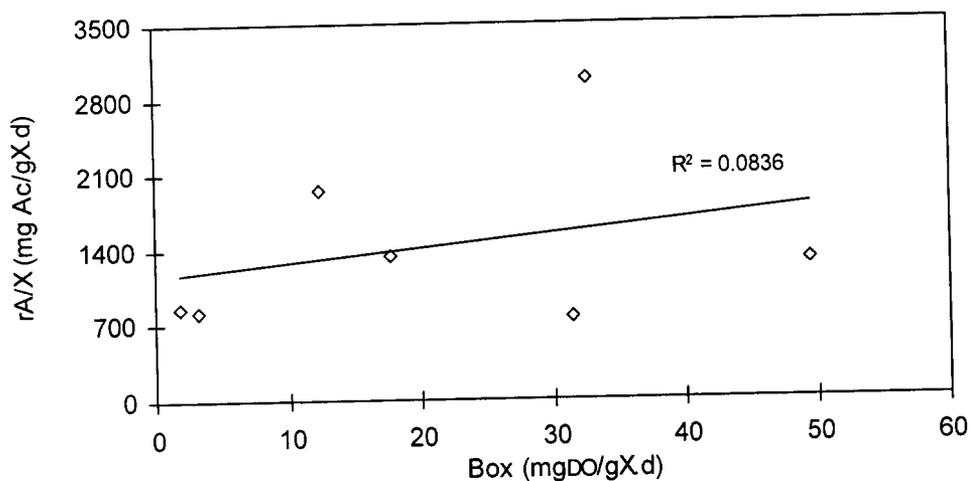


Figura 3.26 Tasa específica de consumo de acetato como una función de la carga de oxígeno.

### 3.2.4 Conclusiones

Los resultados muestran que *B. sphaericus* puede hidrolizar acetamida y usar el acetato para su crecimiento.

La reacción de hidrólisis de acetamida se representa bien como una reacción de orden  $1\frac{1}{2}$  global, siendo de orden  $\frac{1}{2}$  para el sustrato y de orden 1 para la biomasa.

Con 6.4 mg de oxígeno disuelto/L en la alimentación, *B. sphaericus* tiene una  $K_s = 37$  mg/L, una  $\mu_{max} = 0.1$  d<sup>-1</sup>, un  $Y = 0.484$  g<sub>cel</sub>/g<sub>Ac</sub>. y una velocidad de consumo de acetato  $Q_{x/s} = 0.21$  g<sub>Ac</sub>/g<sub>cel</sub>·d.

La hidrólisis de acetamida es dependiente de la concentración de oxígeno en el medio.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS “Y, $V_{\max}$ y $K_s$ ” de *Methanosarcina mazei*.

A diferencia de *M. barkeri*, pocos son los datos reportados en la literatura de las constantes cinéticas de *M. mazei*, por lo que se decidió determinarlas para saber en que condiciones debería operarse el bicultivo.

Las velocidades iniciales de formación de metano se calcularon a partir de la producción de metano con diferentes concentraciones de acetato a través del tiempo (Figura 3.27). Las velocidades iniciales de formación de metano fueron graficadas con las diferentes concentraciones de acetato por la ecuación  $y = V_{\max} [S]/K_s + [S]$ , (Figura 3.28) y la linearización de estos datos por la ecuación de Lineweaver- Burk ( $1/V_o = (K_s/V_{\max}) 1/[S] + 1/V_{\max}$ ), para obtener los valores de  $k_s$  y  $V_{\max}$  (Horton *et al.*, 1981) (Figura 3.29), en donde  $V_{\max} = (\mu_{\max} X) / Y_{x/s}$   $Y_{p/s}$ , ( $Y_{p/s}$  factor estequiométrico de sustrato a metano) y  $Q_{CH_4} = \mu S/K_s + S$ .

El rendimiento celular (Y) de *M. Mazei* no pudo ser determinado debido a que el crecimiento de la bacteria no fue significativo y se tuvieron muchos problemas en la determinación de la biomasa por peso seco. Debido a que *M. mazei* crece formando agregados no fue posible medir el crecimiento por DO. El rendimiento celular se puede calcular a través de la pendiente de la producción de metano.

En la Tabla 3.8 se presentan las constantes cinéticas para *M. mazei* y las constantes de otras cepas del género *Methanosarcina* reportados por Widdel (1988), Jetten *et al.* (1992) y Lawrence y McCarty (1969).

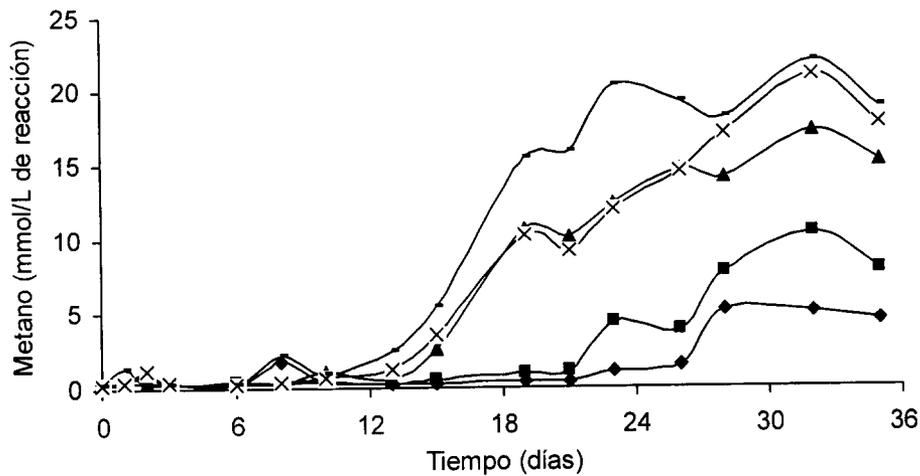


Figura 3.27 Producción de metano por *M. mazei* con diferentes concentraciones de acetato; (◆), 2,4; (■), 4,7; (▲), 12; (X), 16; (-), 24 mM. Medio de Balch con 0.1 g/L de extracto de levadura y peptona de caseína, pH = 7 y T = 35 °C.

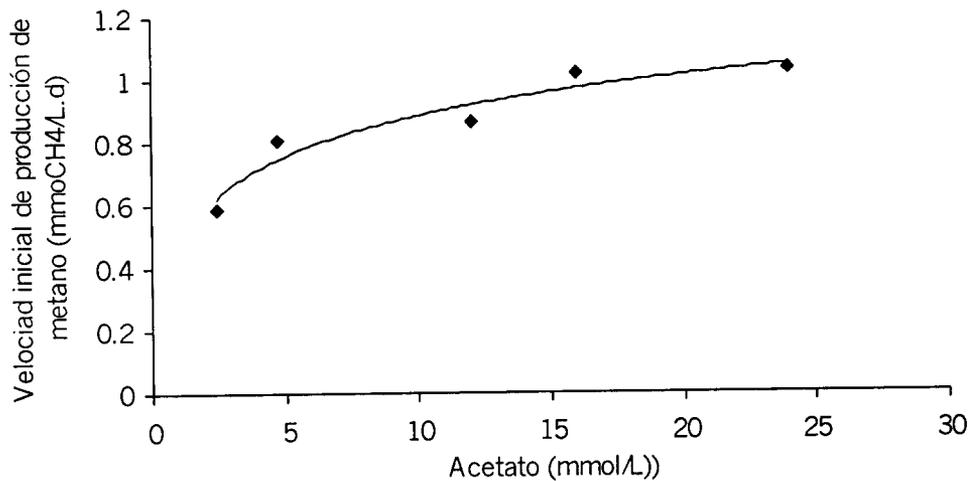


Figura 3.28 Influencia de la concentración de acetato en la velocidad de producción de metano por *M. mazei*.

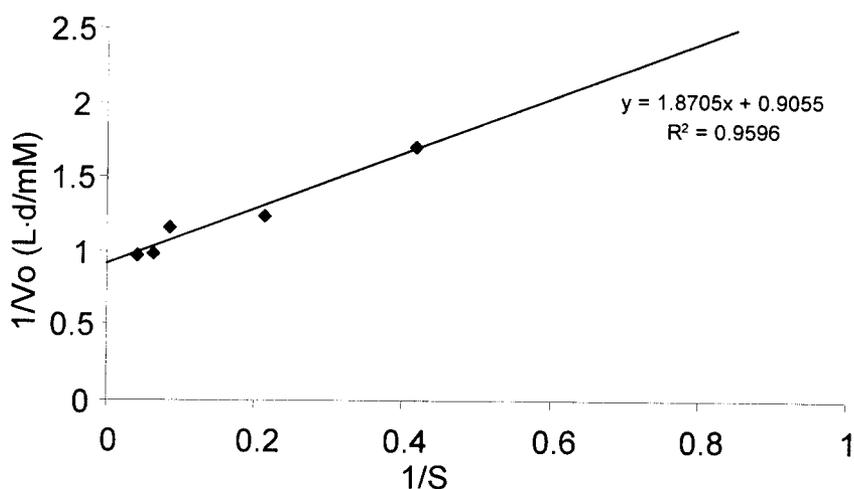


Figura 3.29 Obtención de  $K_s$  y  $\mu_{max}$  de *M. mazei* a partir de acetato, donde  $K_s = 124$  mg/L y  $V_{max} = 0.046$  mmolCH<sub>4</sub>/L·h

Tabla 3.8 Constantes cinéticas de *Methanosarcina*.

Constantes	<i>M. barkeri</i> (1)	Cultivo mixto (2)	<i>M. mazei</i> (este estudio)	<i>Methanosarcina</i> spp. (3)
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.023	0.0104-0.0149	ND	0.0125
$K_s$ (mg/L)	300	165-356	124	180
Y (g <sub>cel</sub> /g <sub>acet</sub> )	0.027-0.053	0.041-0.045	ND	0.035
$V_{max}$ (mmol/L·h)	0.037-0.113	ND	0.046	ND

$\mu_{max}$  = velocidad específica ;  $K_s$  = constante de saturación; Y = rendimiento celular.  
(1) Widdel, 1988; (2) Lawrence y McCarty, 1969; (3) Jetten *et al.*, 1992.

Si se comparan los resultados obtenidos con los que se presentan para este género por otros autores se observa que la  $K_s$  obtenida para *M. mazei* es ligeramente menor a los reportados por estos autores, lo que indica que esta cepa presenta una afinidad mayor por el acetato. La velocidad de formación de metano ( $V_{max}$ ) es similar que la reportada por Widdel, 1988 para una cepa de *M. barkeri*.

### 3.3.1 Conclusiones

*Methanosarcina mazei* bajo condiciones anaerobias, presenta una  $K_s$  para el acetato de 124 mg/L y una  $V_{max}$  de 0.046 mmol<sub>CH<sub>4</sub></sub>/L·h resultados similares a otras especies de este género reportadas en la literatura.

Si comparamos las constantes cinéticas de *B. sphaericus* para el acetato (sección 3.2.3) con las constantes que presenta *M. mazei* y tomando la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max} = 0.042 \text{ h}^{-1}$ ), reportado por Widdel en 1988 podemos operar el bicultivo ya que *B. sphaericus* presenta un valor de una orden de magnitud menor, sin embargo la limitante en el bicultivo será el acetato ya que *B. sphaericus* presenta una mayor afinidad por este compuesto.

### 3.4 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACETAMIDA EN LA PRODUCCIÓN DE METANO POR *M. mazei*

Debido a que la acetamida inhibe el consumo de acetato en *B. sphaericus* (sección 3.2.3), y no es utilizada como fuente de carbono por las bacterias metanogénicas (Guyot *et al.*, 1994), se decidió determinar el efecto que causa en la metanogénesis como una aportación más para la operación del bicultivo. La Figura 3.30 presenta la cinética de formación de metano a partir de acetato y diferentes concentraciones de acetamida.

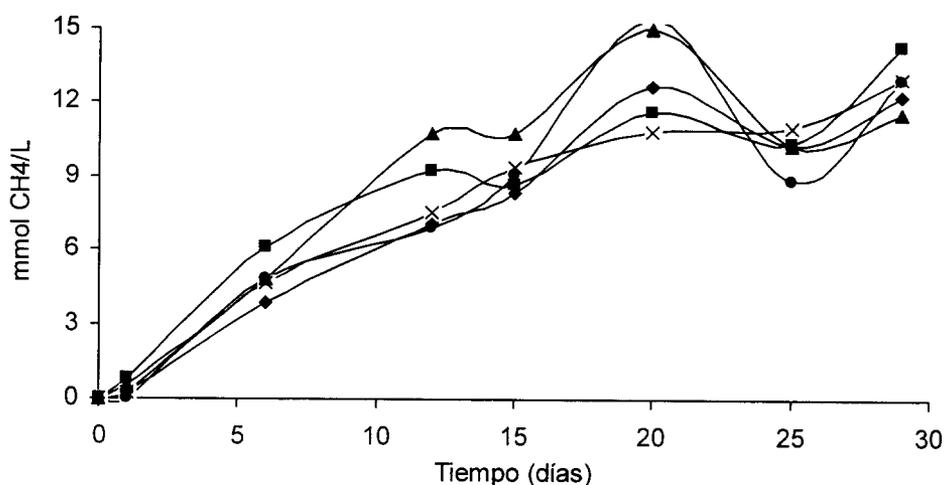


Figura 3.30 Producción de metano a partir de acetato por *M. mazei* con diferentes concentraciones de acetamida. (X), 0; (■), 10; (▲), 15; (◆), 20; (●), 50 mM. Medio de Balch con 0.1 g/L de extracto de levadura y peptona, T = 35 °C y pH de 7.

Se puede observar que la producción de metano no se ve inhibida por la acetamida ya que las velocidades de formación son muy similares a la obtenida para el control sin acetamida (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Velocidades de producción de metano por la cepa de *M. mazei* en presencia de diferentes concentraciones de acetamida.

Acetamida (mmol/L)	0	10	15	20	50
$V_{\max}$ (mmol <sub>CH<sub>4</sub></sub> /L·d)	0.42	0.40	0.39	0.42	0.42

### 3.4.1 Conclusiones

En presencia de acetamida la metanogénesis a partir de acetato no se ve inhibida ya que las velocidades máximas de producción de metano son similares.

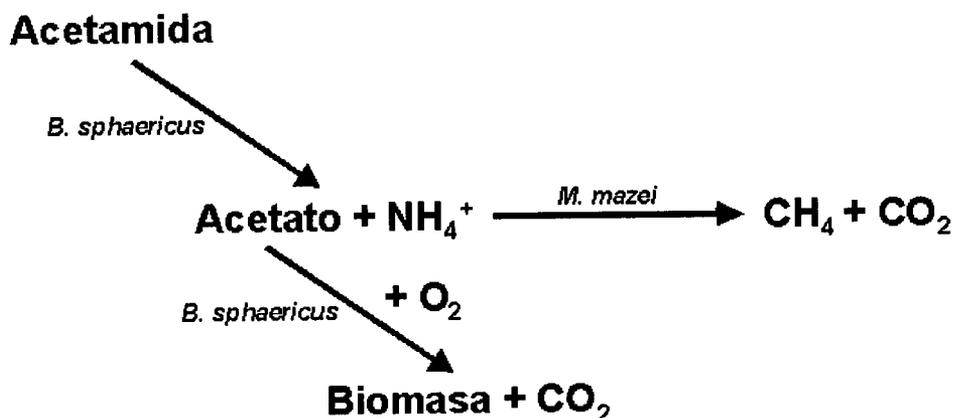
### 3.5 DEGRADACIÓN DE ACETAMIDA POR UN BICULTIVO DE *Bacillus sphaericus* Y *Methanosarcina mazei*

#### 3.5.1 Introducción

La acetamida ha sido transformada en metano y dióxido de carbono en un reactor UASB a través de un proceso en dos etapas. Primero, la acetamida es hidrolizada a acetato y amonio por *B. sphaericus* y el acetato formado fue convertido a metano y dióxido de carbono por bacterias anaerobias estrictas del género *Methanosarcina*, (Guyot *et al.*, 1994; 1995). La coexistencia de estos microorganismos es posible debido a la formación de micronichos, donde el oxígeno disuelto es utilizado por las bacterias aerobias, mientras que las bacterias metanogénicas se encuentran protegidas dentro de la estructura del gránulo.

Con la finalidad de estudiar la dinámica de su coexistencia, una cepa de *B. sphaericus* y *M. mazei* fueron cultivadas en reactores intermitentes y continuo variando las cargas de oxígeno y de acetamida.

La siguiente ecuación describe la degradación de la acetamida por estas dos bacterias:



Como el acetato es también utilizado por *B. sphaericus*, presentando una afinidad ( $K_s = 37$  mg/L) mucho mayor que *M. mazei* ( $K_s = 124$  mg/L), y la hidrólisis de acetamida es dependiente del oxígeno.

¿Cuál será entonces el mecanismo dominante?:

- a) competencia de los dos microorganismos por el sustrato
- b) limitación de *B. sphaericus* por el oxígeno
- c) Inhibición de *M. mazei* por el oxígeno ó
- c) limitación en la transferencia de oxígeno dentro del gránulo.

### 3.5.2 Diseño experimental

Con la finalidad de seleccionar solamente una de las cepas de las bacterias metanógenas (*M. barkeri* o *M. mazei*) para operar el bicultivo, se realizaron bicultivos intermitentes. El diseño experimental para este estudio se describe en la sección 2.7 del capítulo 2.

Dado que la hidrólisis de acetamida es llevada a cabo como una primera etapa de metanización, los resultados obtenidos en el capítulo anterior nos orientan hacia las condiciones a las que debe operar el bicultivo. Estos resultados sugieren que la  $B_x$  puede ser de 1 o 2  $g_{Am}/g_X/d$  y la carga de oxígeno de 3  $mg O_2/g_X \cdot d$  para lograr una alta hidrólisis de acetamida y un bajo consumo de acetato por *B. sphaericus* con el fin de mantener suficiente acetato para la metanogénesis.

El rendimiento que presentan las bacterias metanogénicas es de un orden de magnitud menor que el de *B. sphaericus* bajo estas condiciones, por lo que la

inoculación en el bicultivo deberá tener una proporción de 1:10 *B. sphaericus* y *M. mazei* respectivamente para tener las condiciones de la metanogénesis mas favorecidas, siempre y cuando, *M. mazei* sedimente en el lecho del reactor lo cual es factible ya que tal como otras bacterias metanogénicas, presenta polímeros extracelulares que le confiere adherencia a otras células para formar agregados (Veiga *et al.*, 1997).

Bajo estas condiciones controladas de oxígeno, el bicultivo puede ser posible, ya que *B. sphaericus* crece muy lentamente con una  $\mu_{max}$  de  $0.1 \text{ d}^{-1}$ ; mientras que las bacterias metanogénicas en estas condiciones presentan valores superiores (Pavlostatis y Giraldo-Gómez, 1991; Widdel, 1988).

Debido a las diferencias en las velocidades específicas de crecimiento presentada por ambos microorganismos, las tasas de dilución deberán tener valores que favorezcan la metanogénesis.

Se usó el reactor descrito en la sección 3.2.2.1, modificando la entrada en la parte superior del reactor para la medición del oxígeno disuelto y reduciendo el volumen de operación a 180 mL.

Se esterilizaron el reactor y el medio de cultivo y se inocularon dentro de una cámara anaerobia con el fin de desplazar todo el oxígeno del reactor y evitar el contacto del aire con el cultivo. El reactor fue inoculado por la parte superior de tal manera que la biomasa quedara suspendida en el filtro. Debido a que no se contaba con suficiente biomasa de la bacteria metanogénica el reactor se inoculó con una proporción de 25 mL (20 mg peso seco) de *B. sphaericus* y 75 mL (60 mg peso seco) de *M. mazei*,

ambos cultivos en fase exponencial de crecimiento. El volumen restante del reactor, fue llenado con medio de Balch sin resarzurina y sulfuro de sodio con 1 g/L de acetamida, 0.1 g/L de extracto de levadura, 0.1 g/L de peptona de caseína y con una concentración de oxígeno disuelto en el medio de alimentación de 6.4 mg/L. Para llevar la biomasa a una alta concentración, el reactor permaneció en lote durante 72 horas y posteriormente fue alimentado en continuo según el diseño experimental presentado en la Tabla 3.10. Este diseño estuvo basado en los resultados obtenidos en el capítulo anterior para favorecer la metanogénesis, sin embargo, debido al tamaño del reactor no fue posible operar a tiempos de retención hidráulicos más largos.

**Tabla 3.10 Diseño experimental para el crecimiento de *B. sphaericus* y *M. mazei* en cultivo continuo.**

<b>A<sub>mo</sub> (mg/L)</b>	1,500	2,000	2,000	3,000	3,000
<b>TRH (d)</b>	1.0	2.0	1.5	1.5	2.0
<b>B<sub>v</sub> (g<sub>Am</sub>/L·d)</b>	1.5	1.0	1.33	2.0	1.5

A<sub>mo</sub>, acetamida; TRH, tiempo de residencia hidráulica; B<sub>v</sub>, carga orgánica volumétrica.

### 3.5.3 Resultados y discusión

**3.5.3.1 Bicultivos en lote.** Se evaluó la producción de metano en bicultivos de *B. sphaericus* y dos cepas de *Methanosarcina*. Ninguna de las dos cepas seleccionadas presenta crecimiento con acetamida (Guyot *et al.*, 1994).

Las figuras 3.31 y 3.32 muestran que el metano producido a partir de los bicultivos con *Bacillus sphaericus* y las dos cepas de *Methanosarcina* (*M. barkeri* y *M. mazei*) presentan una fase de retardo muy larga que puede ser el tiempo en que se

consume el oxígeno o debido a las bajas concentraciones de acetato ya que la cepa de *M. mazei* bajo condiciones anaerobias estrictas presenta una fase lag muy larga en la producción de metano con bajas concentraciones de acetato (Figura 3.27). Se puede ver que la producción de metano es mayor en los bicultivos con 2.5 y 3.6 mg/L de oxígeno disuelto, los cuales presentaron una mejor hidrólisis de la acetamida (Tabla 3.11), este comportamiento es similar al reportado en el capítulo 4 para el cultivo continuo de *B. sphaericus*.

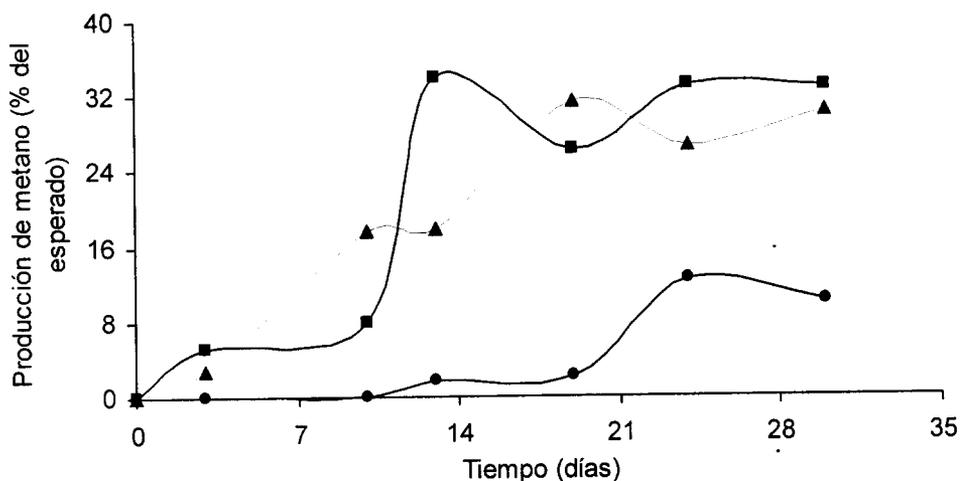


Figura 3.31 Producción de metano por *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina mazei* (cepa S-6) con 10 mM de acetamida y diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (mg/L); (●), 1.4; (▲), 2.5; (■), 3.6.

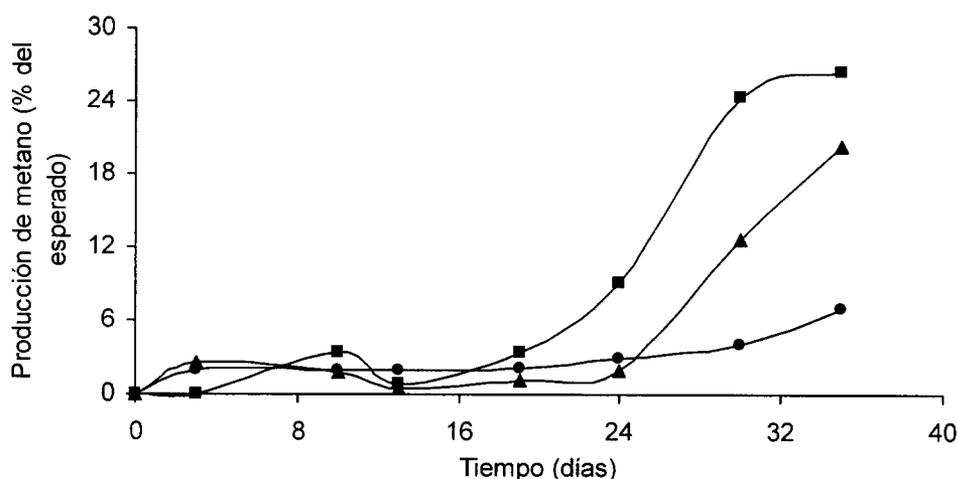


Figura 3.32 Producción de metano por *Bacillus sphaericus* y *Methanosarcina barkeri* (cepa 227) con 10 mM de acetamida y diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (mg/L). (●), 1.4; (▲), 2.5; (■), 3.6.

Tabla 3.11 Degradación de acetamida por *B. sphaericus* y *Methanosarcina* en bicultivos en lote.

	<i>M. mazei</i>			<i>M. barkeri</i>		
	1.4	2.5	3.6	1.4	2.5	3.6
OD <sub>i</sub> (mg/L)	1.4	2.5	3.6	1.4	2.5	3.6
Lag (d)	20	3.0	3.0	30	24	19
Q <sub>CH<sub>4</sub></sub> (mmol/L·d)	0.23	0.42	0.41	0.20	0.30	0.37
Am <sub>i</sub> (mM)	9.5	9.8	10.5	9.8	9.7	9.8
Am <sub>f</sub> (mM)	3.0	1.0	1.0	2.5	1.0	1.0
V <sub>AM</sub> (mM/d)	6.5	8.8	9.5	7.3	8.7	8.8

OD<sub>i</sub>, oxígeno disuelto inicial; Lag, fase de retardo para la producción de metano; Q<sub>CH<sub>4</sub></sub>, velocidad de formación de metano; Am, acetamida, i: inicial, f: final; V<sub>AM</sub>, velocidad de hidrólisis de acetamida.

La hidrólisis de acetamida fue de un 90% a las 24 h. No se detectó oxígeno en los cultivos al final del experimento, indicando que éste fue totalmente consumido *B. sphaericus*. La fase lag de producción de metano es mayor en los cultivos con menos oxígeno disuelto y mucho mayor con la cepa de *M. barkeri*. Las velocidades

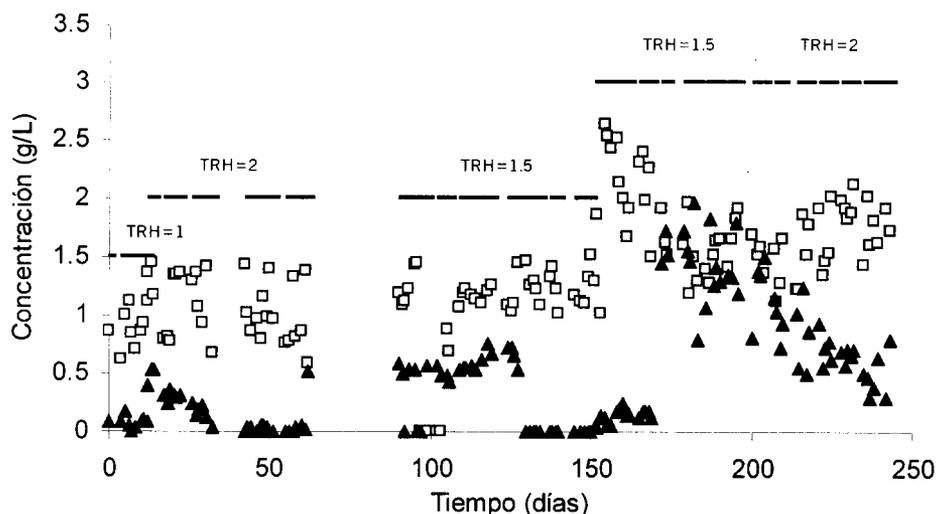
de producción de metano son mayores con la cepa de *M. mazei*. Este comportamiento es debido probablemente a que *M. mazei* presenta una mejor resistencia al oxígeno por la habilidad de formar agregados celulares más grandes que *M. barkeri* y por una mayor velocidad específica de crecimiento (Widdel, 1988). *Methanosarcina* crece formando agregados celulares. Esta estructura dificulta la difusión del oxígeno (Kiener y Leisinger, 1982; 1983).

Dado que el acetato es la fuente de carbono para ambos microorganismos, se espera que a concentraciones bajas el consumo se encuentre desplazado hacia la producción de *B. sphaericus* ya que presenta una  $K_s = 37$  mg/L, mucho menor que la  $K_s$  que presentan las cepas de *Methanosarcina* (Pavlostatis y Giraldo-Gómez, 1991).

**3.5.3.2 Degradación de acetamida por un bicultivo continuo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en presencia de oxígeno.** Los experimentos en continuo se llevaron a cabo con la cepa de *M. mazei* ya que esta cepa presentó mejores resultados en los bicultivos intermitentes.

La Figura 3.33 muestra los cambios de las concentraciones de acetamida, acetato y metano producido durante los diferentes TRH aplicados al reactor. La concentración de oxígeno disuelto en el medio de alimentación se mantuvo constante a 6.4 mg/L. Por falta de agitación en el reactor no fue posible medir el oxígeno en el lecho, por lo que se midió a la salida del reactor presentando valores de cero, indicando que fue consumido para el crecimiento de la bacteria aerobia. La concentración de amonio

en el efluente fue constante y menor de 10 mM, ya que *Methanosarcina* lo puede utilizar como fuente de nitrógeno (García, 1991).



**Figura 3.33** Bicultivo continuo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en presencia de oxígeno. Concentración de acetamida en el influente (-); acetamida en el efluente (□); acetato (▲) .

Se observa que al inicio de cada aumento en la concentración del sustrato el sistema presenta una acumulación de éste, estabilizándose después de cierto período. Cuando se aumenta la acetamida a 3 g/L-d se observa una alta acumulación de acetato y la producción de metano se ve muy poco favorecida a pesar de que en cada carga volumétrica se hicieron reinoculaciones de *M. mazei* (Figura 3.34).

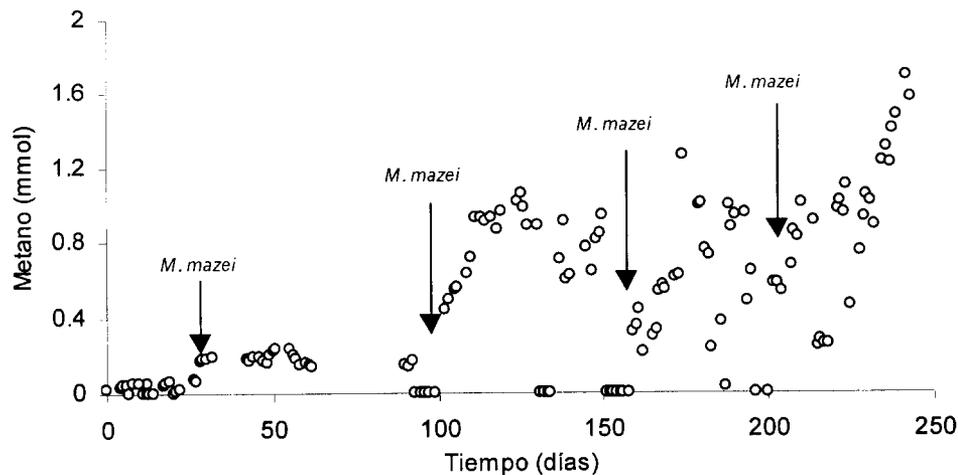


Figura 3.34 Producción de metano por el bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en presencia de oxígeno.

Si se comparan las constantes cinéticas presentadas por estas dos bacterias (Tabla 3.12), se puede ver que aunque *B. sphaericus* presente una velocidad específica de crecimiento de una orden de magnitud menor que la que presenta *M. mazei* por el acetato, la velocidad de consumo de acetato fue ligeramente menor que la de *M. mazei*, pero la constante de afinidad por el sustrato fue tres mayor para *B. sphaericus*, indicando que el consumo de acetato estará desplazado hacia esta bacteria.

Para calcular la eficiencia de producción de metano se comparó el metano producido contra el metano teórico esperado a partir de un balance de masa de acetamida en el reactor (Figura 3.35).

Tabla 3.12. Constantes cinéticas de *B. sphaericus* y *M. mazei* en el bicultivo continuo en presencia de oxígeno

Constantes	<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
$\mu_{\text{Max}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	0.102	1.008
$K_s$ (mg/L)	37	124
$Y$ ( $\text{g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{Ac}}$ )	0.484	ND
$Q_{x/s}$ ( $\text{g}_{\text{Ac}}/\text{g}_{\text{cel}}\cdot\text{d}$ )	0.21	0.19

$\mu_{\text{Max}}$ , velocidad específica de crecimiento;  $K_s$ , constante de afinidad;  $Y$ , rendimiento celular;  $Q_{x/s}$ , velocidad de consumo de acetato.

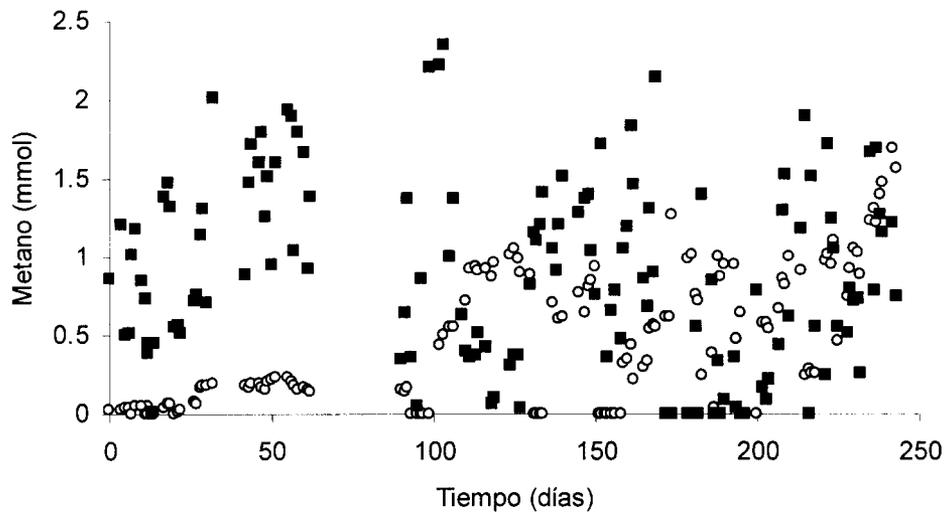


Figura 3.35 Balance del metano teórico esperado y del metano experimental en el bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en presencia de oxígeno. Metano teórico (■), metano teórico; (○), metano experimental.

Se puede observar que en las tres primeras cargas volumétricas aplicadas al reactor, la producción de metano experimental presenta una muy baja eficiencia con respecto al metano teórico esperado, debido a que la cantidad de biomasa de *M. mazei* era muy baja. Después de haber aumentado la biomasa de *M. mazei* a través de las reinoculaciones por 5 veces más que su valor inicial, se observa un aumento en la eficiencia de la producción de metano, alcanzando una eficiencia similar a la

del metano teórico esperada. Esto demuestra que es posible operar el bicultivo en presencia de oxígeno, siempre y cuando el arranque del reactor se haga con concentración de biomasa de la bacteria metanogénica alta.

La Tabla 3.13 muestra los promedios obtenidos durante los estados pseudoestacionarios para cada una de las cargas aplicadas al reactor. Se observa que Los cambios en el sistema se realizaron cuando las desviaciones estándar en la concentración de acetamida se mantuvieron alrededor del 20%.

Tabla 3.13 Degradación de acetamida por *B. Sphaericus* y *M. Mazei* en presencia de oxígeno.

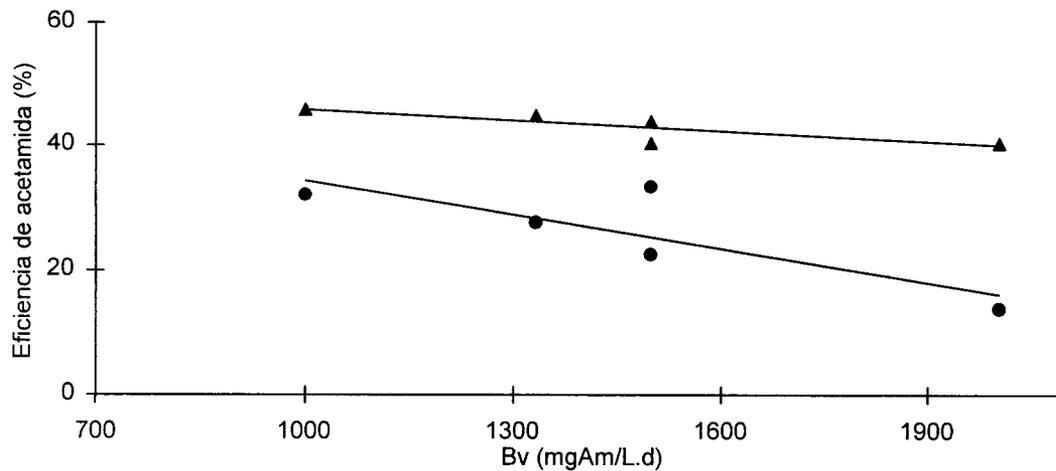
Tiempo (d)	D (d <sup>-1</sup> )	Am <sub>o</sub> (mg/L)	Am (mg/L)	η <sub>m</sub> (%)	Ac (mg/L)	CH <sub>4</sub> (mmol)	O <sub>D</sub> (mg <sub>OD</sub> /L·d)
4-11	1	1,500	892 ± 180	40.54	124 ± 43	0.026	4.22
12-62	0.5	2,000	1082 ± 258	45.88	311 ± 76	0.472	3.2
90-150	0.66	2,000	1103 ± 159	44.87	587 ± 87	0.562	4.22
160-186	0.66	3,000	1785 ± 322	40.51	912 ± 180	0.616	4.22
187-257	0.5	3,000	1677 ± 236	44.09	753 ± 180	0.897	3.2

Am<sub>o</sub>, concentración inicial de acetamida; Am, concentración de acetamida en el efluente; D, tasa de dilución; η<sub>m</sub>, eficiencia de hidrólisis de acetamida; O<sub>D</sub>, carga de oxígeno disuelto; t, tiempo de estado estacionario; CH<sub>4</sub>, metano; Ac, acetato en el efluente.

Para conocer la influencia de la carga orgánica sobre la hidrólisis de la acetamida en el sistema, se graficaron las eficiencias obtenidas en cada etapa así como la remoción de la DQO contra las cargas volumétricas aplicadas.

La Figura 3.36 muestra que la eficiencia en la hidrólisis de acetamida permanece constante en un 40% independientemente de la carga aplicada, no así la remoción de la DQO que disminuye conforme aumenta la carga, indicando que entre mayor es la carga orgánica volumétrica menor es la remoción de la DQO. Esta eficiencia de

remoción es debido a que se está trabajando en la zona óptima de hidrólisis de acetamida pero con una carga específica de acetamida mayor.



**Figura 3.36** Eficiencia de hidrólisis de la acetamida como una función de la carga orgánica volumétrica. (▲) hidrólisis de acetamida; (●) consumo de DQO.

Un estudio realizado por Guyot *et al.* (1995) en un reactor UASB con lodos granulares reportan un decremento en la eficiencia de DQO con altas cargas volumétricas y una acumulación de acetato y acetamida en el reactor.

La Figura 3.37 nos muestra la velocidad de hidrólisis de acetamida ( $\text{mg}_{\text{Am}}/\text{L}\cdot\text{d}$ ) en función de la concentración residual de acetamida y se observa que a mayor concentración, mayor es la velocidad de hidrólisis, hasta llegar a una concentración de 1,600  $\text{mg}/\text{L}$ , donde se observa una saturación en el sistema.

La concentración de acetamida, tanto en la entrada como en la salida del reactor muestran una influencia negativa en la utilización del acetato formado, como se puede observar en la figura 3.38.

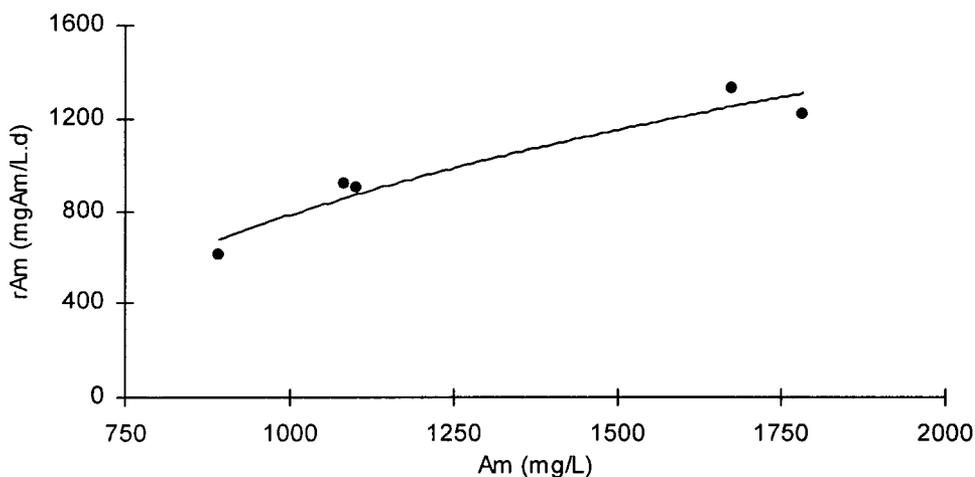


Figura 3.37 Velocidad de hidrólisis como una función de la concentración de acetamida residual.

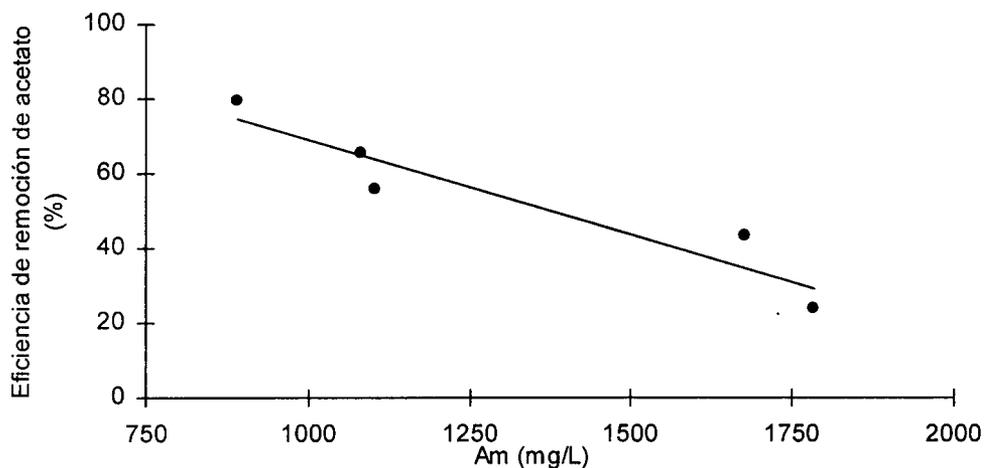


Figura 3.38 Eficiencia de remoción de acetato como una función de la concentración de acetamida residual.

Estos resultados sugieren una inhibición en la utilización del acetato por la presencia de acetamida en el sistema ya que el consumo de éste por *B. sphaericus* no depende del oxígeno, como se demostró en la sección 3.2.3 (Figura 3.28).

Una microfotografía del lecho del reactor muestra que ambos microorganismos están presentes, pero no forman gránulos bien estratificados como lo demuestra Guiot *et al.* (1991), en los lodos de los reactores anaerobios (Figura 3.39). Aunque ambos microorganismos se encuentran formando el lecho, una gran población de *Bacillus* se encontraba suspendido en el reactor.

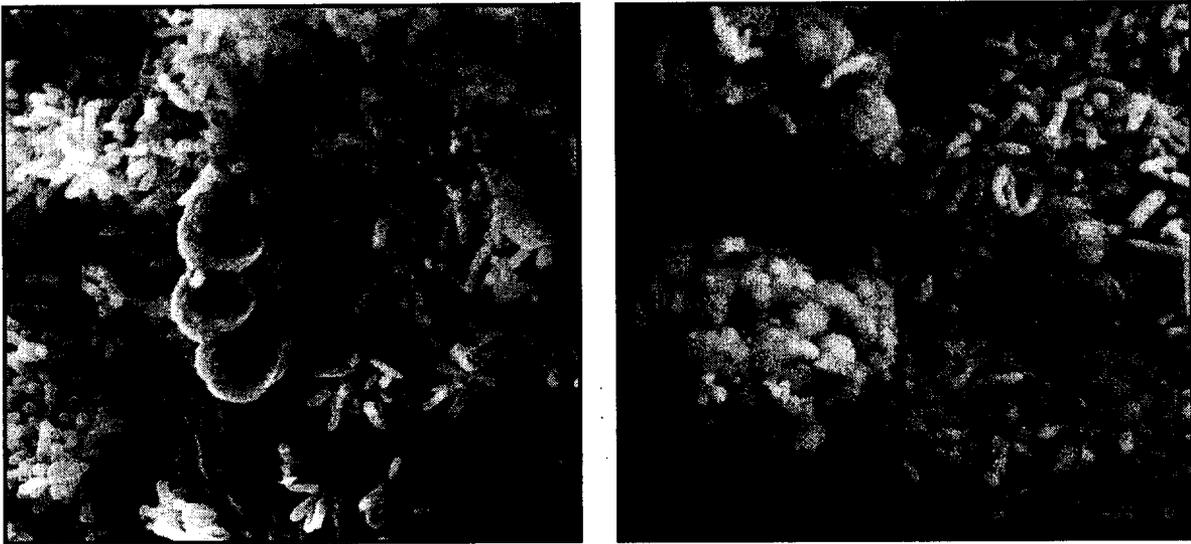


Figura 3.39 Microfotografía electrónica del bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en el lecho del reactor (X 3,000). En la imagen de la derecha se observa que *B. Sphaericus* rodea y cubre a los cocos de *Methanosarcina*. Un acercamiento de la imagen (izquierda) se ve que no forman gránulos.

Las dos bacterias en el lecho presentan diferente actividad. *B. sphaericus* crece suspendido en el medio preferentemente cercano a la entrada del reactor, mientras que *M. mazei* presentan su mayor crecimiento en el soporte. Este comportamiento fue demostrado con una prueba de actividad microbiana de muestras tomadas a la entrada, en el lecho y a la salida del reactor (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Crecimiento de *B. sphaericus* y actividad metanogénica de *M. mazei* en el reactor continuo.

Origen del muestra	<i>B. sphaericus</i> (UFC/mL)	Actividad metanogénica (gDQO/gSSV·d)
Entrada	$1.35 \times 10^7$	0
Lecho	3	0.76
Salida	$2.10 \times 10^6$	0

UFC = unidades formadoras de colonias

Mientras que en la entrada no se presentó actividad metanogénica, *B. sphaericus* crece bien. En el lecho se presentó una actividad metanogénica de 0.76 gDQO/gSSV·d y no hubo crecimiento aeróbico. El resultado de la actividad metanogénica en el lecho es mayor que la reportada por Guyot *et al.* (1994), en un cultivo en lote utilizando acetamida con lodos anaerobios lo que demuestra que el crecimiento de *M. mazei* en el reactor no se vio inhibido.

### 3.5.4 Conclusiones

Los resultados de los bicultivos intermitentes demuestran que es posible llevar a cabo una sinergia entre una bacteria aerobia estricta y una anaerobia estricta, si la presencia de oxígeno no daña a las bacterias metanogénicas, ya que se observó que el metano se empieza a producir una vez que se consumió el oxígeno.

El bicultivo continuo no puede metanizar de manera eficiente la acetamida debido que una gran cantidad del acetato formado es consumido rápidamente para la formación de biomasa de *Bacillus*, ya que presenta una mayor afinidad y una mayor velocidad de consumo por el acetato.

El acetato acumulado puede ser convertido a metano por *M. mazei* pero su eficiencia depende de la cantidad de biomasa en el lecho, ya que se observó que el metano experimental es similar al metano teórico después de varias reinoculaciones.

Las dos bacterias se encuentran formando el lecho, pero su actividad depende de la concentración de oxígeno en el medio, ya que se encontró que la mayor población de *B. sphaericus* se encontraba en la zona más rica en oxígeno, mientras que *M. mazei* solamente crece en el soporte.



# 4

## CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

---

### 4.1 CONCLUSIONES

- ◆ En base a las características presentadas por *Bacillus sphaericus*, puede clasificarse a esta bacteria como aerobia estricta, con requerimientos nutricionales complejos, mesófila y neutrófila, capaz de utilizar acetato, piruvato, proteínas, acetamida y otras amidas alifáticas.
- ◆ *Bacillus sphaericus* es capaz de hidrolizar la acetamida y usar el acetato para su crecimiento. Con 6.4 mg /L de oxígeno en la alimentación presenta una  $K_s$  de 37 mg/L, una  $\mu_{max}$  de 0.102 d<sup>-1</sup> y un rendimiento celular de 0.484 g<sub>cel</sub>/g<sub>Acetato</sub>.
- ◆ La reacción de hidrólisis de acetamida llevada a cabo por *B. sphaericus* es activada por la disponibilidad de oxígeno.

- ◆ Debido a sus características fisiológicas, excepto por su necesidad de oxígeno, *Bacillus sphaericus* puede operar en bicultivo con bacterias metanógenas, ya que presenta condiciones de cultivo muy similares.
- ◆ En experimentos independientes en reactores intermitentes con limitación de oxígeno, el metano en los bicultivos de *B. sphaericus* y bacterias del género *Methanosarcina* se produjo una vez que se consumió el oxígeno.
- ◆ El bicultivo de *B. sphaericus* y *M. mazei* en continuo no pudo metanizar de manera eficiente la acetamida, debido principalmente que una gran cantidad del acetato formado fue consumida rápidamente para la formación de biomasa de *Bacillus*.
- ◆ La eficiencia de la metanogénesis, es dependiente de la concentración de biomasa de la bacteria metanogénica en el lecho del reactor.

## 4.2 RECOMENDACIONES

Para lograr una mayor eficiencia en la producción de metano, sería recomendable producir antes del arranque del bicultivo en continuo, una gran cantidad de biomasa de *Methanosarcina* bajo condiciones anaerobias, utilizando acetato como fuente de carbono y posteriormente inocular el reactor con *B. sphaericus* en presencia de acetamida y oxígeno.

## REFERENCIAS

---

- Alibhaik, R.K., and Foster, C.F., (1986). Physicochemical and biological characteristic of sludge produced in anaerobic upflow sludge blanket reactors. *Enzyme Microbiology and Technology*, **8**: 601-606.
- Andreesen, J.R., Gottschal, G., and Schiegel, H.G., (1970). *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Archives of Microbiology*, **72**: 154-174.
- Atkinson, B., and Mavituna, F., (1991). Microbial activity. In: **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**. M. Stockton Press. pp. 169-242.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., and Wolfe, R.S., (1977). *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **27**: 355-361.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., and Wolfe, R.S., (1979). Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, **43**: 260-296.
- Bartholomew, J.W., (1981). **Staining procedures**. Fourth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 375-404.
- Boone, D.R., and Bryant, M.P., (1980). Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, **40**: 626-632.
- Brock, T.D., and Madigan, M.T., (1991). **Biology of microorganisms**. Prentice Hall. New Jersey. 5<sup>a</sup>. Edition.

- Buchanann, R.E., Gibbons, N.E., (1974). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Vol. 2. William & Wilkins, Baltimore. pp. 529-550.
- Burke, W.F., and McDonald, K.O., (1983). Naturally occurring antibiotic resistance in *Bacillus sphaericus* and *Bacillus licheniformis*. *Current Microbiology*, **9**: 69-72.
- Chapman, S.J., Veal, D.A., and Lynch, J.M., (1992). Effect of oxygen concentration on dinitrogen fixation and volatile fatty acid production by *Clostridium butyricum* growing in association with fungi on cellulose and on wheat straw. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**: 9-15.
- Claus, D., and Beckele, R.C.W., (1986). The genus *Bacillus*. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. William & Wilkins, Baltimore.
- Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen Heft*, **2**: 127-224.
- DeLange, R.J., Chang, J.Y., Shaper, J.H., and Galzer, A.N., (1976). Amino acid sequence of flagellin of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Biological and Chemistry*, **251**: 705-711.
- DiGeronimo, M.J., Antoine, A.D., (1976). Metabolism of acetonitrile and propionitrile by *Nocardia rhodochrous* LL100-21. *Applied Environmental Microbiology*, **31**: 900-906.
- Ellermann, J., Hedderich, R., Bocher, R., and Thauer, R.K., (1988). The final step in methane formation, investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal Biochemistry*, **172**: 669-677.
- Fetzer, S., Bak, F., Conrad, R., (1993). Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and dissiccation. *FEMS Microbial Ecology*, **12**: 107-115.
- Field, J.A., Stams, J.M., Kato, M. and Schraa, J., (1995). Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*, **67**: 47-77.
- García, J.L., (1990). Taxonomy and ecology of methanogens. *FEMS Microbiology Reviews*, **87**: 297-308.
- Gerritse, J., Schut, F., and Gottschal, J.C., (1990). Mixed chemostat culture of obligately aerobic and fermentative or methanogenic bacteria grown under oxygen-limiting conditions. *FEMS Microbiology Letters*, **66**: 87-94.

- Gerritse, J., and Gottschal, J.C., (1992). Mineralization of the herbicide 2,3,6-trichlorobenzoic acid by a co-culture of anaerobic and aerobic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **101**: 89-98.
- Gerritse, J., and Gottschal, J. C., (1993). Two- membered mixed cultures of methanogenic and aerobic bacteria in O<sub>2</sub>-limited chemostats. *Journal of General Microbiology*, **139**: 1853-1860.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C.H.N., (1973). **The genus *Bacillus***. Agricultural Handbook No. 427. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Washington D.C.
- Gordon, R.F., and Smith, N.R., (1973). Aerobic sporofforming bacteria capable of growth at high temperatures. *Journal of Bacteriology*, **58**: 327-341.
- Gottschal, J.C., and Szewzyk, R., (1985). Growth of a facultative anaerobe under oxygen-limiting conditions in pure culture and in co-culture with a sulfate-reducing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, **31**: 159-170.
- Guiot, S., Pauss, A., and Costerton, W., (1991). A structured model of the anaerobic granule consortium. Sixth International Symposium on anaerobic digestion. Posters Abstract. Brazil.
- Guyot, J.P., (1988). Microbiología de la digestión anaerobia. Manual del curso Tratamiento anaerobio de aguas residuales-Microbiología y Bioquímica. Medellin, Colombia, 1-87.
- Guyot, J.P., and Ramírez, F., (1989). Inhibition of the anaerobic acetate degradation by formate. *Biotechnology Letters*, **11**(5): 365-368.
- Guyot, J.P., and Fajardo, C., (1993). Activates sludge transformation in anoxic condition. *Biotechnology Letters*, 15-17.
- Guyot, J.P., Ramírez F., and Ollivier, B., (1994). Synergistic degradation of acetamide by methanogens and an aerobic Gram-positive rod. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**: 452-456.
- Guyot, J.P., Ferrer, H., and Ramírez, F., (1995). Methane production from acetamide in an upflow anaerobic sludge-blanket reactor based on a synergistic association between an aerobic rod and methanogens. *Applied Microbiology Biotechnology*, **43**: 1107-1111.
- Hakulinen, R., Woods, S., Ferguson, J., and Benjamin, M., (1985). The role of facultative anaerobic micro-organisms in anaerobic biodegradation of chlorophenols. *Water Science and Technology*, **17**: 289-301.

- Halliwell B., (1977). The Toxic Action of Oxygen on Living Organisms. In: Biotechnology. Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Symposium in Tutzing Alemania. Nanographics 1670-1692. Band 81. Verlag Chemic, New York. pp.1-14.
- Heinz, S., Hans, G.T., Mortimer, P.S., Balows, A., and Schlegel, H.G., (1986). **The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.** Volume II. Cap. 8. Springer-Verlag. New York. pp. 1237-1286.
- Holdeman, L.V., Cato, E.P., and Moore, W.E.C., (eds.), (1977). **Anaerobe Laboratory Manual.** Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. pp. 65-152.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology.** Ninth edition. Williams & Wilkins, Baltimore. pp719-136.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., and Scringeur, K.G., (1995). **Bioquímica.** 1<sup>a</sup> Edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. Cap. 5: 51-1 a 51-2.
- Hungate, R.E., (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds.). **Methods in microbiology.** Vol. 3B. Academic Press Inc., New York. pp. 117-132.
- Hungerer, K.D., and Tipper, D.J., (1969). Cell wall polymers of *Bacillus sphaericus* 9602. I. Structure of the vegetative cell wall peptidoglycan. *Biochemistry*, **8**: 3577-3587.
- Jablonski, P.E., and Ferry, J.G., (1991). Purification and properties of methyl coenzyme M methylreductase from acetate grown *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Bacteriology*, **173**: 2481-2487.
- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., and Zehnder, A.J.B., (1989). Purification and characterization of an oxygen stable carbon monoxide dehydrogenase of *Methanotherix soehngenii*. *Journal of Biochemistry*, **181**: 385-391.
- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., and Zehnder, A.J.B., (1992). Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soengenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Reviews*, **88**: 181-198.
- Kato M., Field, J., and Lettinga, G., (1993). High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, **42**: 1360-1366.
- Kenealy, W.R., and Zeikus, J.G. (1982). One-carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of

- catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology*, **151**: 932-941.
- Kiener, A., and Leisinger, T., (1982). Plating efficiency of methanogenic bacteria. *Experientia*, **38**: 1379.
- Kiener, A., and Leisinger, T., (1983). Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Systematic Applied Microbiology*, **4**: 305-312.
- Koser, S.A., (1968). *Bacillus* and *Clostridium*. In: C. Thomas. **Vitamin requirements of bacteria and yeast's**. Springfield, Illinois. pp. 379-401.
- Krieg, A. (1981). The genus *Bacillus*: Insect pathogens In: Starr, M.P., Stolp, H., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. Vol. II. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1743-1752.
- Krzycki, J.A., Lehman, L.J., and Zeikus, J.G., (1985). Acetate catabolism by *Methanosarcina barkeri*: evidence for involvement of CO dehydrogenase, methyl-coenzyme M and methylreductase. *Journal of Bacteriology*, **163**: 1000-1006.
- Kubo, M., Okajima, J., and Hasumi, F., (1994). Isolation and characterization of soybean waste degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products. *Applied Environmental and Microbiology*, **60**(1): 243-247.
- Kuenen, J.G., Hassan, H.M., Krinsky, N.I., Morri, J.G., Pfennig, N., Schlegel, H., Shilo, M., Vogels, G.D., Weser, U., Wolfe, R., (1979). Oxygen Toxicity. In: M. Shilo (ed.). **Strategies of microbial life in extreme environments**. Life Sciences Report. Vol. 13. Verlag chemie, New York. pp. 223-241.
- Lapent, J.P., (1994). Les Archaeobacteria (ou Archaea). L'Information du Biotechnicien. *Actualites scientifiques*, **2**(1): 45-54.
- Lettinga, G., De Zeuw, W.J., Hulshoff, P.L.H., Hobma, S.W., Grin, P.C., Weigant, W.M., Van Velsen, A.F.M., and Koster, I.W., (1982). Anaerobic wastewater treatment using the UASB treatment process. Memorias del 28° Simposio Avances en Digestion: Combustibles por fermentación. UAMI-ICAITI, Guatemala. pp. 78-85.
- Lettinga, G., Van Velsen, A.F.M., Hobman, S.W., De Zeeuw, W., and Klapwijk, A., (1980). Use of upflow sludge blanket reactor concept for biological wastewater treatment specially for anaerobic treatment. *Biotechnology Bioengineering*, **22**(4): 699-734.

- Macarie, H., and Guiot, S., (1995). Degradación de pentaclorofenol mediante un proceso aerobio/anaerobio simultáneo: una nueva tecnología para el tratamiento de aguas residuales. In: E. Galindo (Ed.). **Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería**. SMBB, México D.F. pp. 317-324.
- McCarty, P.L., and Smith, D.P., (1986). Anaerobic waste water treatment. *Environmental Science and Technology*, **20**: 1200-1206.
- McFadin, J.F., (1991). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Médica Panamericana. España, 1ª Edición. pp. 40-44, 142-148, 154-160.
- McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell R.B., and Costerton, (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen nov. sp. nov., an anaerobic syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied Environmental and Microbiology*, 1029-1039.
- Mohamed, S., Kirit, N., Chapatuala, D., and Wolfram, J.H., (1989). Degradation of acetonitrile by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**(9): 2267-2274.
- Moretti, T.A., (1978). Acetic acid derivatives (acetamide). In: Kirk-Othmer. **Encyclopedia of Chemical Technology**. 3<sup>rd</sup> Edition. Vol. 1. John Wiley & Sons, New York. pp. 148-151.
- Morris, JG., (1976). Oxygen and the Obligate Anaerobe. Fifth Stenhouse-Williams Memorial Lecture. *Journal of Applied Bacteriology*, **40**: 229-244.
- Mortimer, P.S., Heinz, S., Hans, G.T., Balows, A., and Schlegel, H.G., (1981). **The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. Volume II. Springer-Verlag. New York. pp. 1213-1265.
- Muller, M.D., and Buser, H.R., (1995). Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 2. Stereo- and enantioselective degradation in sewage sludge and soil. *Environmental Science and Technology*, **29**: 2031-2037.
- Noeth, C., Britz, T.J., and Joubert, W.A., (1988). The isolation and characterization of the aerobic endospore-forming bacteria present in the liquid phase of an anaerobic fixed-bed digester, while treating a petrochemical effluent. *Microbial Ecology*, **16**: 233-240.
- Norris, J.R. (1981). *Sporosarcina* and *Sporolactobacillus*. In: Berckelely, R.C.W., Goodfellow, M. (eds.). **Classification and identification of the aerobic endosporeforming bacteria**. Academic Press, London. pp. 337-357.

- Noyola, A., Guyot, J.P., and Monroy, O., (1988). Comparación experimental de dos tipos de reactores anaerobios avanzados. Memorias del I Simposio Nacional sobre Ingeniería Ambiental. UNAM, México. pp.179-197.
- Orduz, S., Restrejo, N., Diaz, T., and William, R., (1993). Isolation and characterization of thirteen new strains of *Bacillus sphaericus* from Colombia toxic to *Culex quinquefasciatus* larvae. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. **88**(4): 629-632.
- Oremland, R.S., (1988). Biogeochemistry of methanogenic bacteria. In: Zehnder, A.J.B. (ed.) **Biology of anaerobic microorganisms**. Chapter 12th. John Wiley & Sons, New York. pp. 641-705.
- Owens, J.D., and Legan, J.D., (1987). Determination of the Monod substrate saturation constant for microbial growth. *FEMS Microbiology Review*, **46**: 419-432.
- Patel, G.B., and Sprott, G.D., (1990). *Methanosaeta concilii* sp. nov. ("Methanotrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40**: 79-82.
- Pavlostathis, S.G., and Giraldo, E., (1991). Kinetics of anaerobic treatment. In: M.S. Switzenbaum (ed.). **Anaerobic treatment technology for municipal and industrial wastewater**. International Association on water pollution research and control. Pergamon Press, Inc. G.B. pp. 35-60.
- Pirt, J.S., (1985). **Principles of microbe and cell cultivation**. Blackwell Scientific Publications. USA.
- Pundle., A.V., and Raman, S.H., (1994). Penicilin V acylase from *Bacillus sphaericus*. *Biotechnology Letters*, **16**(10): 1041-1046.
- Quintero R., (1980). **Biotecnología**. Editorial Alhambra. México.
- Ramírez F., (1993). Aislamiento e identificación de las bacterias involucradas en la degradación de acetamida en lodos de un reactor UASB. Reporte de período sabático. CONACyT. México, D.F.
- Ramírez, F., Monroy, O., Favela, E., Guyot, J.P. and Cruz, F., (1998). Acetamide degradation by a continuous-Fed Batch Culture of *Bacillus sphaericus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **70-72**: 215-223.
- Ranftl, H., (1972). Zellwandzusammensetzung bei *Bacillen* und *Sporosarcina*. Ph. D. thesis Technical University, Munich.

- Riviera-Ramírez, R., Rodríguez-Rodríguez, G., Razo-Flores, E., y Bremauntz-Michavila, M.P., (1993). Algunos Aspectos acerca del Proceso de Digestión Anaerobia. Parte II: Bioquímica. *Revista Latino Americana de Microbiología*, **35**: 451-458.
- Robinson, W.G., and Hook, R.H., (1964). Ricine nitrilase. Reaction product and substrate specificity. *Journal Biological and Chemical*, **239**: 4257-4262.
- Rouviere, P.E., and Wolfe, R.S., (1988). Novel Biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemical*, **263**: 7913-7916.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H.C., and Albagnac, G., (1986). *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligatery proton reducing anaerobe oxidizing saturated and insaturated long chain fatty acids. *Archives of Microbiology*, **145**: 142-147.
- Scott, R.Y., Williams., T.N., Whimore, T.N., and Lloyd, D., (1985). Mass spectrometric determinations of the effect of oxygen on methanogenesis: inhibition or stimulation? R. K. Poole and C.S., Dow (eds). Academic Press. London. pp.263-269.
- Schmidt, J.E., and Ahring, B.K., (1996). Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**: 29-246.
- Seki, T., Chung, C.K., Mikami, H., and Oshima, Y., (1978). Deoxyribonucleic acid homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **28**: 182-189.
- Smith, N.R., Gordon. R.E., Clark, F.E., (1946). Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publications 559.
- Smith, N.R., Gordon, R.E., Clark. F.E., (1952). Aerobic sporeforming bacteria. U.S. Department of Agriculture Monograph 16.
- Smith, P.H., and Mah, R.A., (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied Microbiology*, **14**: 368-371.
- Smith, M.R., and Mah, R.A. (1978). Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**: 870-879.
- Thauer, R.K., Zinkhan-Moller., and Spormann, A.M., (1989). Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **43**: 43-67.

- Toerien, D.F., (1967). Direct-isolation studies on the aerobic and facultative anaerobic bacterial flora of anaerobic digester receiving raw sewage sludge. *Water Research*, **1**: 55-59.
- Toerien, D.F., and Hattingih, W.H.J., (1969). Anaerobic digestion. The microbiology of anaerobic digestion. *Water Research*, **3**: 385-416.
- Van Assche, R.F., (1982). Microbiological aspects of anaerobic digestion. *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**: 520.
- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W.M., Hollingsworth, R.I. and Zeikus, J.G., (1997). Composition and Role of Extracellular Polymers in Methanogenic granules. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**:2: 403-407.
- Widdel, F., (1988). Microbiology and ecology of sulfate and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder, A.J.B. (ed.). **Biology of anaerobic microorganisms**. Chapter 10. John Wiley & Sons, New York. pp. 510-513.
- Widdel, F., (1986). Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohol's as hydrogen donors. *Applied and Environmental Microbiology*, **51**: 1056-1062.
- Wimpenny, J.W.T., and Abdollahi, H., (1991). Growth of mixed cultures of *Paracoccus denitrificans* and *Desulfovibrio desulfuricans* in homogeneous and heterogeneous culture systems. *Microbial Ecology*, **22**: 1-13.
- Woese, C.R., and Fox, G.E., (1978). Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, **11**: 245-252.
- Yamada, H., Asano, Y., Hing, T., and Tani, Y., (1979). Microbial utilization of acrylonitrile. *Journal of Fermentation Technology*, **5**: 8-14.
- Zehnder, A.J.B., Huser, B.A., Brock, T.D., and Wurhmann, K., (1980). Characterization of an acetate-decarboxylating non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. *Archives of Microbiology*, **124**: 1-11.
- Zehnder, A.J.B., (1988). **Biology of Anaerobic Microorganisms**. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. pp. 820-826.



# **PUBLICACIÓN RELACIONADA CON ESTA TESIS**

---

Ramírez, F., Monroy, O., Favela, E., Guyot, J.P., y Cruz, F., (1998). Acetamide degradation by a continuous-fed batch culture of *Bacillus sphaericus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **70-72**: 215-223.

Copyright © 1998 by Humana Press Inc.  
All rights of any nature whatsoever reserved.  
0273-2289/98/70-72-0215\$10.25

## Acetamide Degradation by a Continuous-Fed Batch Culture of *Bacillus sphaericus*

F. RAMIREZ, O. MONROY,\* E. FAVELA, J. P. GUYOT,  
AND F. CRUZ

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A P 55-535, 09340, Iztapalapa, D.F., MEXICO <sup>1</sup>Invited professor from ORSTOM, present address PMC, 911 Avenue Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

### ABSTRACT

The methanogenesis of acetamide occurs through a two-step reaction in methanogenic sludges. First, acetamide is hydrolyzed to acetate and ammonia by a strict aerobic bacterium (*Bacillus sphaericus*), then acetate is used by *Bacillus* as carbon source or converted to methane by methanogens. In this work, the kinetics of acetamide degradation by *B. sphaericus* was studied in a continuous reactor with biomass accumulation, fed with acetamide. The oxygen supplied was dissolved in the feed (6.4 mg/L) to resemble conditions in an anaerobic wastewater treatment reactor. A reaction in series model (acetamide → acetate → biomass) was used to find the kinetic parameters. Results show that *B. sphaericus* can hydrolyze acetamide in a second-order reaction with  $K_1 = 1.1 \text{ L/g/d}$ , implying that the amount of biomass determines the rate and that no reaction will take place at specific loading rates greater than  $35 \text{ gAm/gX/d}$ . Growth parameters on acetate, as carbon source, under limiting  $\text{O}_2$  conditions, are  $\mu_{\text{max}} = 0.102/\text{d}$ ,  $K_s = 37 \text{ mg/L}$ ,  $Y = 0.081 \text{ gX/gAm}$ .

**Index Entries:** Acetamide; hydrolysis; *Bacillus sphaericus*; continuous culture with biomass accumulation; UASB reactor.

### INTRODUCTION

Acetamide is a highly toxic xenobiotic compound widely used in the lacquer, cosmetic, explosive, textile, and pharmaceutical industries (1), and it is also produced by acetonitrile biodegradation (2).

Acetamide degradation has been studied in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor (7). It was found that at low acetamide loading rates ( $B_v = 1 \text{ g/L/d}$ ), 86% removal efficiencies were obtained;

\* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Table 1  
Experimental Design for Growth of *B. sphaericus* in Continuous Culture

$A_{m_0}$ (mg/L)	1000	1500	2000	3000	3000	3000	3000
HRT (d)	1	1	1	1	2	3	0.5

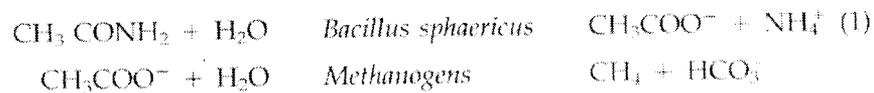
$A_{m_0}$ , inlet acetamide concentration; HRT, hydraulic retention time.

Table 2  
Kinetic Equations for Acetamide Uptake, Acetate Production,  
and Biomass Growth

$r_1$ $r_2$ $r_3$	$r_4$		
$\frac{dA_m}{dt} = r_{Am} = -K_1 \cdot A_m \cdot X$		Sequence reaction (2)	
$\frac{dAc}{dt} = +K_1 \cdot A_m \cdot X$	$\frac{\mu_{max} \cdot Ac \cdot X}{K_{Ac} + Ac \cdot Y}$	Acetate production (4) and uptake	
$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} \cdot Ac}{K_{Ac} + Ac} \cdot X$		Monod (5)	

increasing  $B_v$  caused lower removal efficiencies. It was also noticed that acetamide caused inhibition of acetate methanization.

It was later found (6) that this degradation was possible through a synergistic association between a sporulating, Gram-positive, strictly aerobic rod, which transformed acetamide to acetate, and ammonia and methanogens, which transformed acetate to methane (6).



The coexistence of facultative aerobes with strict anaerobes is possible when aerobic bacteria take up the available oxygen in the media (3-8).

Acetamide degradation can be modeled in a two-step consecutive reaction, in order to find out if the rate limitations are caused by dissolved oxygen limitations or by the acetamide substrate inhibition. Therefore, the acetamide hydrolysis kinetics by *B. sphaericus* were studied in a continuous tubular reactor, with biomass accumulation, under limited amounts of oxygen.

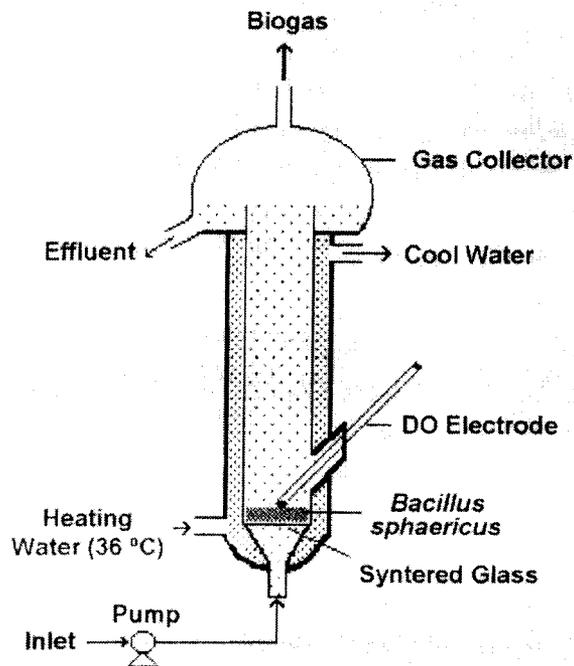


Fig. 1. Tubular reactor with synered glass to retain the *B. sphaericus* biomass, and a gas separator.

## MATERIAL AND METHODS

### Continuous Cultivation

A 0.8-L continuous-operation volume tubular reactor (Fig. 1) was operated at 34–36°C to hydrolyze acetamide. It was inoculated with 80 mL of a pure strain of *B. sphaericus* in the exponential growth phase isolated from a UASB reactor (7).

The feed was a solution consisting of Balch medium (9), oligoelements, 0.5 g/L yeast extract, 0.1 g/L of casein peptone and acetamide, and saturated with air to get an oxygen concentration of 6.4 mg/L. Acetamide concentration and hydraulic retention times were varied, as shown in Table 1, to assess the kinetics constants. The media was adjusted to pH 7.0, and sterilized in an autoclave.

### Analyses

Acetamide and acetate were determined in a Varian gas chromatograph with a flame ionization detector, using a capillary column (0.22 mm × 30 m) (At-1000, Alltech), with helium as carrier gas. One-mL samples were pretreated with 50 µL of formic acid by centrifugation at 3000 rpm

Table 3  
Transient Mass Balances in *B. sphaericus*  
Growth in Continuous Culture with Biomass  
Accumulation

$$\frac{dAm}{dt} = D(Am_0 - Am) - K_1AmX \quad (6)$$

$$\frac{dAc}{dt} = -Dac + AmX - \frac{\mu^*Ac}{K_{Ac} + Ac} \frac{X}{Y_{XS}} \quad (7)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (8)$$

for 15 min. Biomass was measured by OD<sub>600 nm</sub> (Bausch & Lomb, Spectronic 20), and calibrated against known concentrations of *B. sphaericus*. Oxygen concentration was measured with a HACH meter (HACH, Loveland, CO).

#### Kinetic Characterization of the Strain

The affinity ( $K_s$ ), the maximum specific growth rate ( $\mu_m$ ), and the yield ( $Y$ ) constants were determined with the sequence reaction kinetic equations and mass balances shown in Tables 2 and 3, respectively. The acetamide hydrolysis is modeled as a second-order reaction (Eq. 3), in which acetate is an intermediate product in a sequence reaction (Eq. 2 and 4). Biomass growth follows Monod kinetics (Eq. 5). The liquid phase is in continuous flow while biomass is retained within the vessel.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the acetamide loading rates ( $B_v$ ) applied to the reactor, together with the outgoing rates of acetamide and acetate. The largest acetamide uptake efficiency was observed at a  $B_v = 1$  gAm L/d. At  $B_v = 1.5$ , acetate accumulates and the biomass remains constant (Fig. 3). It is only in the  $B_v = 2$  when biomass starts to accumulate, while acetate and acetamide start to be consumed. By  $B_v = 3$ , acetate is being totally consumed, while biomass growth rate is the highest. When the  $B_v$  is again reduced to 1.5 by increasing the HRT, biomass builds up to 900 mg/L. With this high biomass concentration, acetamide and acetate are both at almost zero. During this period, there is no acetamide hydrolysis and no growth, probably because of the sevenfold specific acetamide load to the bacteria (Fig. 4).

Although a limited amount of oxygen is being fed to the reactor, Table 4 shows that the reaction itself is not limited by oxygen, because the amount available for the bacteria is inversely proportional to the biomass concentration.

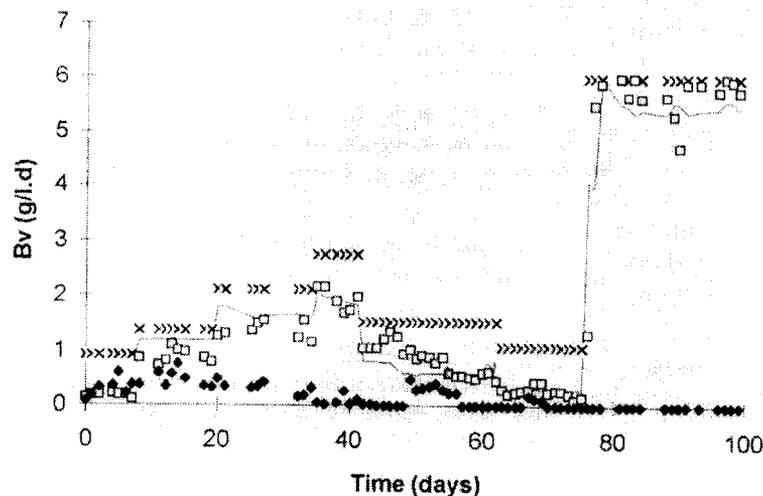


Fig. 2. Continuous culture of *B. sphaericus*; acetamide loading rate (X), acetamide (□), and acetate (◆) accumulation rates. The acetamide predicted behavior (-) as described in Eq. 3 with  $K_S = 37$  mg/L and  $\mu_m = 0.10$  per d.

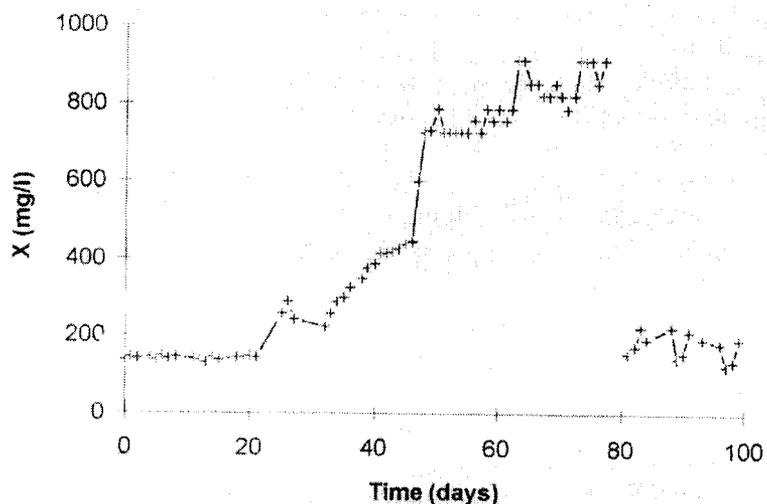


Fig. 3. *B. sphaericus* biomass accumulation in the tubular reactor exposed to several loading rates. The brokes line is a reinoculation of the reactor.

The hydrolysis rate of acetamide follows a second-order reaction, as shown in Eq. 3. Reaction constants were evaluated by both algebraic (selecting steady states) and differential methods (taking discrete increments in differential Eq. 6), in order to take all the experimental points into ac-

Table 4  
Acetamide Hydrolysis by *B. sphaericus*

$B_v$ (g/l/d)	$Am_i$ (mg/L)	$\eta_m$ (%)	Ac (mg/L)	$\eta_c$ (%)	X (mg/L)	$B_{OD}$ (mgOD/gXd)	$B_s$ (gAm/gXd)
1	1000	88	411	41	157	32.6	6.4
1.5	1500	44	536	36	163.25	31.4	9.2
2	2000	37	354	18	288.25	18	7
3	3000	28	31.2	1	413.25	12.4	7.26
1.5	3000	43	0	0	788.25	3.2	1.9
1	3000	78	0	0	913	2	1.1
6	3000	4.4	0	0	207	49.46	29

$B_v$ , acetamide loading rate;  $Am_i$ , acetamide concentration;  $\eta$ , conversion efficiencies; Ac, acetate concentration; X, biomass; subindex: v = volumetric; x = specific; m = acetamide; c = acetate; and OD = oxygen dissolved.

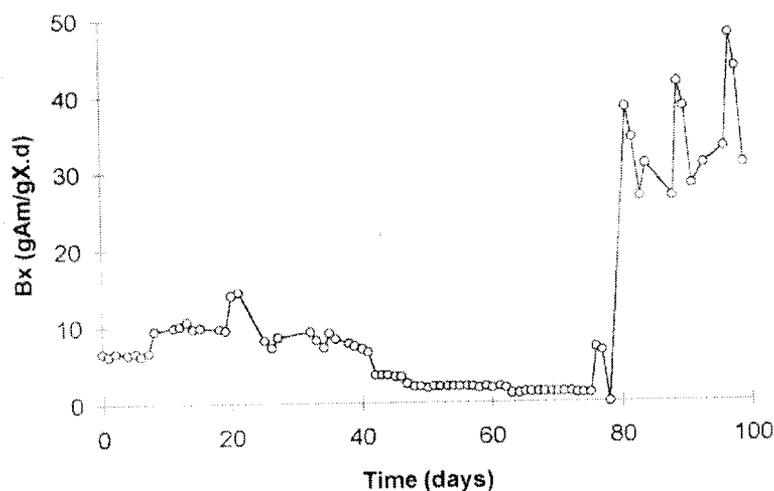


Fig. 4. Specific acetamide loading rate (gAm/gXd).

count. The results obtained by these two methods were similar:  $K_i = 1.1$  and  $0.8 \text{ L/gXd}$  for the algebraic and differential methods, respectively. The continuous line in Fig. 4 shows the predicted values obtained by Eq. 6.

Solving Eqs. 7 and 8 simultaneously, the growth yield coefficient was found to be  $Y_{X/Ac} = 0.018 \text{ gX/gAc}$ .

Figure 3 shows a period of exponential growth between d 30 and 48. It was used to estimate the kinetic parameters of Monod equation. By equating Eqs. 5 and 8, and solving for a linear regression, the values of  $\mu_m$  and  $K_s$  were estimated to be  $0.102 \text{ per d}$  and  $0.0367 \text{ gAc/L}$ , respectively.

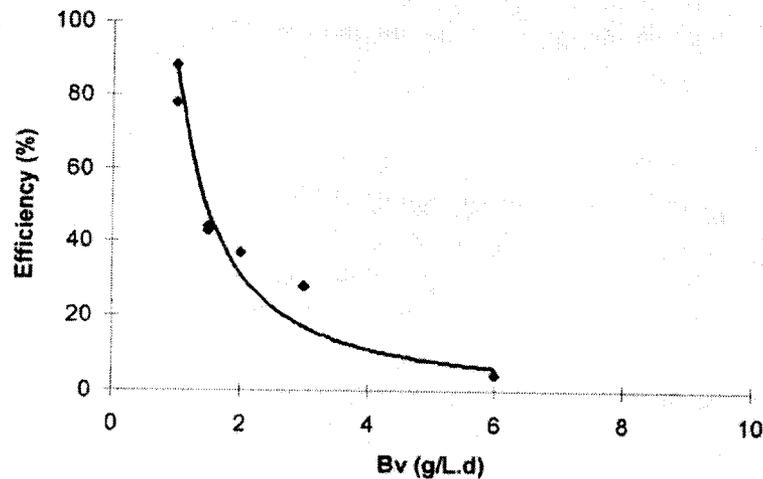


Fig. 5. Hydrolysis efficiency as a function of  $B_v$ . Large efficiencies are obtained at low rates.

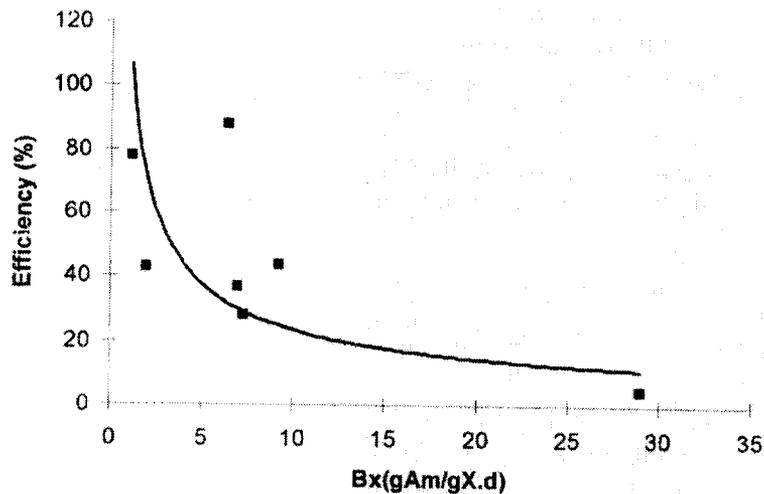


Fig. 6. The hydrolysis efficiency, as a function of the biomass loading rate, shows the same tendency as the  $B_v$  effect.

Table 4 shows the steady-state values of each run. From these data, Fig. 5 shows that the hydrolysis efficiency drops as  $B_v$  increases. This is also associated to the biomass loading rate ( $B_x = \text{gAm/gX/d}$ ) (Fig. 6).

The specific acetamide hydrolysis rate (gAm/gX/d) is a negative function of acetamide concentration, thus suggesting acetamide substrate inhibition (Fig. 7). Two runs are out of this tendency, because the reaction rate

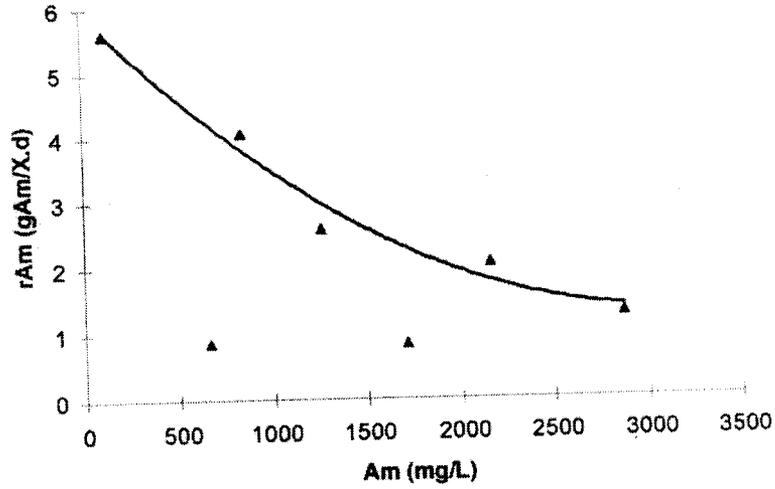


Fig. 7. The specific acetamide hydrolysis rate, as a function of the concentration, suggests a decreasing rate with increasing concentration. The two points out of the tendency are limited by loading rate.

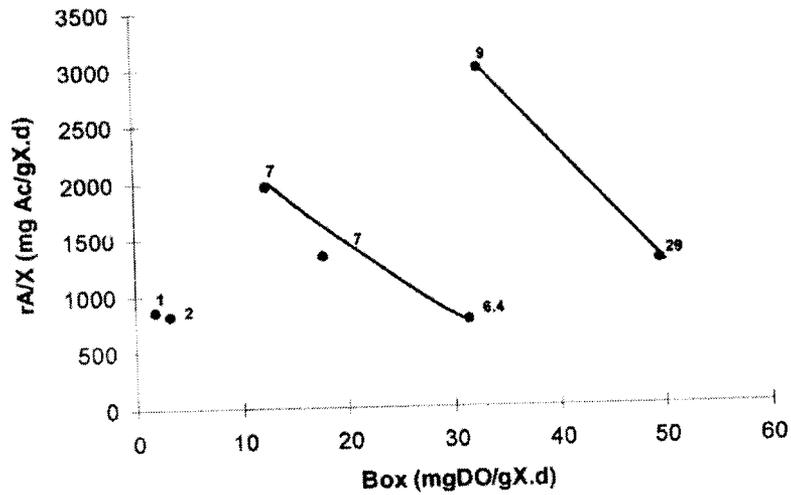


Fig. 8. Specific acetate consumption rate shows the negative effect of the  $B_{ox}$  at three different levels of  $B_{ox}$ .

(gAc/L/d) is limited by the loading rate (gAmo/L/d), and the specific oxygen loading rate ( $B_{ox}$ ).

The acetate uptake rate is negatively influenced by the level of specific oxygen loading rate ( $B_{ox} = \text{mg O}_2/\text{g X/d}$ ). Figure 8 shows the specific acetate consumption rate as a function of both the  $B_{ox}$  and the  $B_x$ . It suggests that increasing  $B_{ox}$  adversely affects the acetate consumption rate. Three  $B_x$  levels can be distinguished here, one at the level 1–2 gAm/gX/d, another at around 7, and a third one of  $B_x \geq 9$ , suggesting that increasing specific acetamide loads need more oxygen.

## CONCLUSIONS

These results show that *B. sphaericus* can degrade acetamide and does not need the participation of methanogens for it to use acetate as substrate for growth. At 6.4 mg oxygen/L, *B. sphaericus* exhibited a  $K_s$  for acetate of 37 mg/L, which makes it a better scavenger than methanogens that have  $K_s = 160\text{--}300$  mg/L. Under these conditions, the coculture is possible, because *B. sphaericus* grows slowly with a  $\mu_m = 0.10$  per d; methanogens exhibit twice this value (10).

Given that the hydrolysis of acetamide is intended as a first step for its methanization, the present study orients toward the coculture conditions. Results suggest that, in order to promote high acetamide hydrolysis and keep a low acetate consumption rate by *B. sphaericus*, the biomass loading rates ( $B_x$ ) should be about 1 or 2 gAm/gX/d at low Am concentrations and low oxygen-loading rates ( $B_{ox} = 3 \text{ mgO}_2/\text{gAm/d}$ ). Under these conditions there would be enough acetate for the methanogens.

## REFERENCES

1. Moretti, T. A. (1978), in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* vol. 1. Mark H. F., McKetta J. J., and Othmer D. F., eds. John Wiley, New York, pp. 148–151.
2. DiGeronimo, M. J. and Antoine, A. D. (1967), *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 900–906.
3. Gerritse, J. and Gottschal J. C., (1993), *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1853–1860.
4. Guyot, J. P. and Fajardo, C. (1993), *Biotechnol. Lett.* **15**, 743–748.
5. Guyot, J. P., Gutierrez, G., and Rojas, M. G. (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 139–142.
6. Guyot, J. P., Ramírez, F., and Ollivier, B. (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 452–456.
7. Guyot, J. P., Ferrer, H., and Ramírez F. (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 1107–1111.
8. Wu, W., Hu, J., Gu, X., Zhao, Y., Zhang, H., and Gu, G. (1987), *Water Res.* **21**, 789–799.
9. Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., and Wolfe, R. S. (1979), *Microbiol. Rev.* **43**, 260–296.
10. Pavlostathis, S. G. and Giraldo Gomez, E. (1991), *Water Sci. Tech.* **24**, 35–39.