

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE METANOGÉNICAS AISLADAS DE UN SISTEMA DI-FAFS OPERADO CON LIXIVIADO, AGUA RESIDUAL Y ESTIÉRCOL PORCINO

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF METHANOGENIC ISOLATED SYSTEM DI-FAFS SYSTEM OPERATED WITH LEACHATE, PIG MANURE AND WASTEWATER

*Ortiz C.¹Jorge L., Rodríguez C.²Jarson A., Cajiao P.³Ángela M., Maldonado Julio I. ⁴

1. Microbiólogo, Laboratorio Aguas, Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona. Correo: *allisonortiz87@gmail.com
2. M. Sc (C) Maestría en Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona. Correo: jalexisrch@gmail.com
3. M. Sc (C). Docente, Directora Cepario, Coordinadora de Laboratorios Microbiología. Universidad de Pamplona. Correo: angelacajiaooster@gmail.com
4. M.Sc. Docente, Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingenierías y Arquitectura. Universidad de Pamplona. Correo: jimaldonadom@hotmail.com

Recibido 21 de Julio 2015; aceptado 30 de octubre de 2015

RESUMEN

Las bacterias metanogénicas, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en ambientes anoxigénicos, obtienen su energía mediante la producción metabólica de gas metano, son reductores de sulfatos por el acetato y el hidrógeno disponibles para su supervivencia, a través de procesos de hidrólisis y acetogénesis; además son esenciales en la degradación anaerobia de la materia orgánica en la naturaleza. El objeto de este proyecto fue aislar y caracterizar fenotípicamente la biota presente en la fase metanogénica presente en un sistema DI-FAFS, operado con lixiviado, estiércol porcino y aguas residuales ubicado en los laboratorios de ingeniería ambiental de la Universidad de Pamplona Norte de Santander, Colombia. El procedimiento incluyó la toma de muestra desde los biodigestores, aislamiento en medios modificados

específicos selectivos, caracterización macroscópica y microscópica con coloración de Gram e identificación metabólica, fenotípica y verificación de producción de metano mediante prueba piloto. Se pudo establecer la presencia de bacterias metanogénicas, presuntivamente de los géneros Methanobacterium spp y Methanococcus spp a partir de las muestras seleccionadas para el estudio. Se ultimó que la temperatura variable para la producción de metano en medio modificado fue de 28°C, donde se obtuvo un mayor porcentaje de eficiencia del biogás en estudio alrededor 0,375 cm³ CH₄/Día.

Autor a quien dirigirse la correspondencia. Correo Electronico:
*allisonortiz87@gmail.com.co

Palabras clave: *Ambientes anoxigénicos, bacterias metanogénicas, Di-Fafs, producción de metano.*

ABSTRACT

Methanogens bacteria are widely distributed in nature in environments anoxygenic; they get energy by metabolic producing methane gas, are sulfate reducers by acetate and hydrogen available for their survival, through processes of hydrolysis and acetogenesis; they are also essential in the anaerobic degradation of organic matter in nature. The purpose of this project was to isolate and characterize phenotypically biota present in this methanogenic phase in a DI-FAFS system operated with leachate, pig manure and wastewater laboratories located in environmental engineering from the University Of Pamplona Norte De Santander, Colombia. The procedure included sampling from biodigesters, modified isolation in selective media specific, characterization macroscopic, microscopic characterization with Gram stain and metabolic identification, phenotypic and verification of methane production by pilot.

It was established the presence of methanogenic bacteria, presumably gender Methanobacterium spp and Methanococcus spp from the samples selected for the study. Finalized the variable temperature for methane production in modified medium was 28 °C, where a higher percentage of efficiency of biogas study around 0,375 cm³CH₄ / day was obtained.

Keywords: *Anoxygenic environments, Di-FAFs, ethanogenic bacteria, methane production.*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias metanogénicas están ampliamente distribuidas en la naturaleza en ambientes anoxigénicos; con mayor frecuencia estos se establecen en ambientes terrestres como microambientes, medio en suelos, en bosques y praderas, aguas pantanales (Woese C, 1979), (Balch E, 1976). Este último ambiente les genera competencia con microorganismos reductores de sulfatos por el acetato y el hidrógeno disponibles para su supervivencia, sustratos que pueden ser reemplazados por las metilaminas, excretadas por algunos animales (Fredrickson JK, 2003) Existen varios grupos de bacterias metanogénicas que se diferencian entre sí por su morfología; se pueden encontrar bacilos y cocos filamentosos, agrupados en cadenas, diplococos, tétradas y racimos. Pueden desarrollarse a temperaturas que van desde

a 38 °C a 75 °C y su afinidad al Gram es variable (B., 2000).

Este tipo de organismo tiene una gran importancia ecológica, por intervenir en la degradación de la materia orgánica, en el ciclo del carbono y por ello estas bacterias permiten ser empleadas en diferentes procesos biotecnológicos en sistemas anaerobios (Ormond DR, 2006) produciendo gas metano a partir de estiércol de cerdo (Acuña, 2002); además como modelo experimental en simulación de suelos de otros planetas (Smith PH, 1958).

Teniendo en cuenta la importancia de estos microorganismos en las técnicas de biorremediación para la conservación del medio ambiente, este estudio planteó establecer la identificación de los mismos

en este tipo de procesos anaerobios, y así ser empleadas como herramientas de tipo biotecnológico como así mismo de tratamiento de aguas residuales.

En este sistema, las bacterias anaerobias están fijadas a la superficie de un soporte inerte (en forma de biofilms), columna de relleno, o atrapadas en los intersticios de éste, con flujo vertical. El soporte puede ser de material cerámico o plástico. Su distribución puede ser irregular (filtro anaerobio propiamente dicho, con flujo ascendente), y en este caso las bacterias se encuentran mayoritariamente atrapadas en los intersticios, o regular y orientado verticalmente, y en este caso la actividad es debida básicamente a las bacterias fijadas, recibiendo el nombre de lecho fijo con flujo descendente (IDAE, 2007).

Luego de la hidrólisis dan inicio las fases de acidogénesis y acetogénesis, donde actúan microorganismos productores de hidrógeno y dan como resultado del proceso de digestión el ácido acético junto con el CO_2 y el H_2 (Figura 1). En este momento del proceso los microorganismos anaerobios han degradado la mayor parte de la biomasa (Acuña, 2002). Los ácidos grasos volátiles que son producto de la fase acetilénica serán utilizados como sustrato durante la siguiente fase. Durante la fase de metanogénesis actúan un amplio grupo de

microorganismos anaerobios que convierten los productos de las fases anteriores en metano. Este último grupo de microorganismos son los más delicados y afectados por los siguientes factores: la temperatura, la concentración de sólidos, la mezcla del fango, el pH y los ácidos volátiles (Hernández, 2001).

El objeto del presente estudio fue aislar y caracterizar fenotípicamente la biota presente en la fase metanogénica de un sistema de filtros anaerobios de flujo ascendente (Julio I. Maldonado 1993), separado en dos fases DI-FAFS (Ana Cláudia BARANA 2, 2000), (Ortiz J.M. 1992) Operado con lixiviado, estiércol porcino y aguas residuales, el aislamiento contribuye al trabajo de *“tratamiento de lixiviados en filtros anaerobios de flujo ascendente separado en dos fases”* y de conservar estos microorganismos en el cepario de la Universidad de Pamplona.

Dentro de los alcances propuestos para realizar esta investigación se estableció el poder identificar fenotípicamente el grupo de microorganismos que llevaban a cabo el proceso de metanogénesis, como también evaluar la producción de biogás del sistema, algunas de las limitaciones que se presentaron dentro del proceso residió en la operatividad de los bioreactores

MATERIALES Y MÉTODOS

Las bacterias metanogénicas están El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios del GIMBIO grupo de investigación adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, durante el periodo comprendido entre el mes de julio y octubre del 2014.

Se realizaron tres muestreos en total para el estudio los cuales fueron directamente sobre cada punto de análisis del biodigestor, inicialmente se tomaron de cada sitio 5ml lo cuales se adicionaron a tubos de ensayos previamente esterilizados y su interior con un contenido de 0.001 de tiosulfato con el fin de preservar la muestra, este procedimiento se realizó para los primeros 2 muestreos, para el tercer muestreó se utilizó la técnica del hisopo la cual consistía en tomar el inculo directamente de cada punto de muestreó en la parte donde se encontraban los biofilms. Todas las muestras se mantuvieron bajo condiciones de anaerobiosis, manteniendo los tubos herméticamente cerrados para prevenir el menor contacto con el oxígeno.

A cada muestra para la caracterización de Archaeas Metanogénicas se le realizaron las siguientes determinaciones:

Methanobacterium spp ufc/ml, *Methanococcus spp* ufc/ml, Anaerobios totales ufc/ml, Anaerobios mesofilos ufc/ml, e identificación fenotípica y preservación de los microorganismos presentes.

Aislamiento de la población bacteriana

Para el aislamiento de las bacterias metanogénicas se utilizaron los medios selectivos Barker-Taha (MB) para *Methanobacterium* y Stadtman–Barker (MC) para *Methanococcus*, (Paola A. Acuña G. et al 2008), medio AT para bacterias ruminales totales y medios SPS para anaerobios mesófilos, estos medios incluyen diversos sustratos que son utilizados por estos microorganismos como fuente de energía para su crecimiento y metabolismo. (Atlas, 2010).

Se inocularon 100µL (siembra en superficie) de cada muestra en los medios empleados, los cuales posteriormente fueron incubados y bajo estrictas condiciones de anaerobiosis a temperatura de 37 °C por un periodo de 24 - 48 horas Transcurrido este tiempo se verifico el crecimiento bacteriano donde se tuvo en cuenta las características macroscópicas, donde se evaluó: color, tamaño y forma de las colonias y

microscópicas donde se valoró el tipo de morfología mediante la coloración de Gram.

Identificación fenotípica y producción de metano

Las pruebas bioquímicas fueron aplicadas a todas las cepas bacterianas aisladas, lo que permitió analizar los principales sustratos que degradan y la fuente de energía utilizada; a través del empleo de medios de cultivo con indicadores.

Las cepas aisladas se caracterizaron fenotípicamente evaluando morfología, coloración de Gram, identificación bioquímica donde se aplicaron pruebas básicas como: xilosa (oxid), glucosa (oxid), fructosa (oxid), tsi (merck), lia (oxid), citrato (merk), sim (merk), motilidad. (merck), urea. (merck) vp (oxid), mv (oxid), triptófano (oxid).

La capacidad metabólica de los microorganismos para producir metano se verificó por la disminución del volumen del KOH en las probetas, que es inversamente proporcional al gas producido por los microorganismos aislados *Methanococcus spp* y *Methanobacterium spp*.

La verificación de la producción metabólica de gas metano, se realizó mediante los elementos que componían el sistema de

producción de metano: tubos 9 x 150 mm con desprendimiento lateral, tapones de algodón con parafina, mangueras en látex de 20 cm y beaker de 50ml mas tubos de centrifugación de 13ml. Posteriormente se armó el sistema, se le agrego a la muestra que contenían los tubos una Solución A (0.1 % NH₄Cl, 0.04 % K₂HPO₄, 0.01 % MgCl₂, 2 % acetato de calcio, y 1 % metanol, pH 7.0) y luego se Sumerge Tubo II en solución de 0.1N KOH. Este tubo recogerá el gas metano que se produzca.

El metano desplazará la solución de KOH del Tubo II. (Ver figura 1). El inóculo provino directamente de los puntos de muestreo de cada bioreactor.

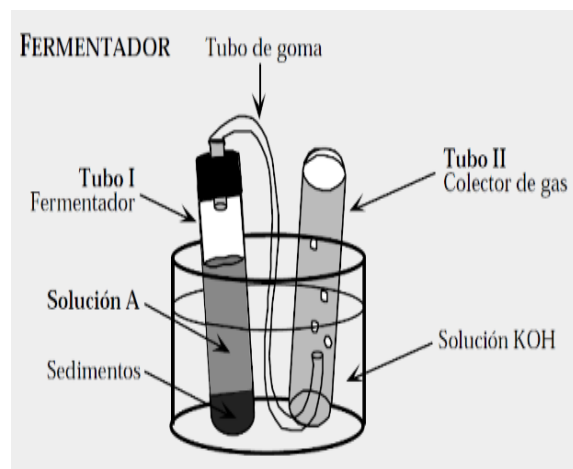


Figura 1. Representación esquemática de la producción de CH₄. (UPRM.EDU); Guía para la medición de Biogas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los aislamientos bacterianos en los medios selectivos MC y MB indicaron crecimiento de bacterias con características similares con *Methanococcus spp* y *Methanobacterium spp*. La confirmación morfológica mediante coloración de Gram se presenta en la tabla 1.

Las tipologías macroscópicas de las colonias obtenidas en los agares fueron las siguientes: en el agar MC para *Methanococcus spp* se observó la presencia de colonias puntiformes, pequeñas de color azul y en el agar MB para *Methanobacterium spp* las colonias que crecieron fueron redondas grandes, crecieron fueron redondas grandes, pegajosas, brillantes, que toman el color del medio café-traslucidas.

Tabla 1. Resultado Gram de los agares MC y MB.

Muestreo No	Medio mb	Medio mc
1 MUESTREO	Bacilos Gram(+)	Cocos Gram(-)
2 MUESTREO	Bacilos Gram(+)	Diplococos Gram(-)
3 MUESTREO	Bacilos Gram(+)	Cocos Gram(-)

En las **Figura 2 y 3** se observan las colonias obtenidas en los agares MC y MB.

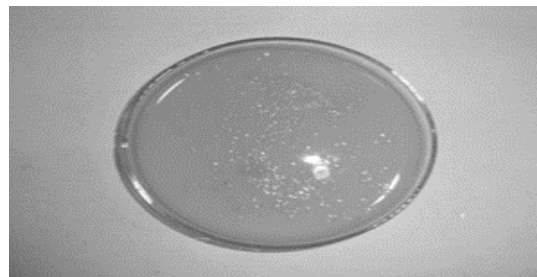


Figura 2. Colonias obtenidas en el agar MC

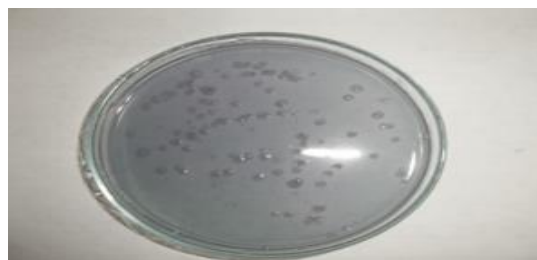


Figura 3. Colonias obtenidas en el agar MB

Para el análisis de bacterias anaerobias totales ruminales se realizó un estudio en un medio modificado con líquido ruminal y carbonato de calcio, identificando y evaluando algunos géneros de bacterias por microscopia y macroscopia de las colonias; teniendo en cuenta: la forma, color, aspecto (liso y rugoso).

El aislamiento de las colonias se realizó en agar nutritivo más glucosa con una posterior tinción de Gram para la diferenciación bacteriana. Características microscópicas: Coco- bacilos Gram-negativos
Características macroscópicas: Colonias

amarillas claras, pequeñas, brillantes y cremosas, con bordes lisos y convexas como se observa en la figura 4.

Además, se aislaron anaerobios mesofilicos sulforeductores evidenciándose el crecimiento de Colonias en Agar SPS (como se evidencia en la figura 5.), de color negro anaerobias, producción de gas, seca y opaca, que corresponden presuntivamente a *Clostridium spp* un microorganismo considerado como un patógeno humano. Posteriormente se realizó siembra en agar nutritivo más glucosa, seguidamente tinción de Gram para la diferenciación bacteriana.

El uso del medio modificado selectivo y de enriquecimientos para este grupo bacteriano (medios líquidos y sólidos), resultaron óptimos para el crecimiento y asilamiento de bacterias utilizadoras de formato, metanol, metalaminas o acetato. Al final del proceso de aislamiento en estos medios, se obtuvieron dos bacterias morfológicamente distintas, un bacilo Gram+ y un coco Gram-.

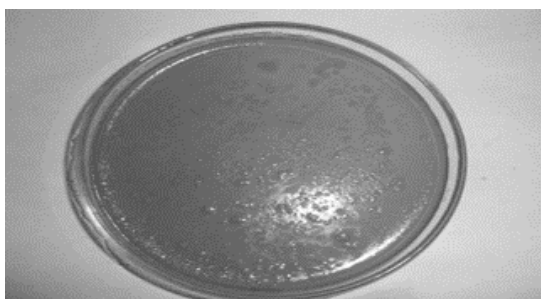


Figura 4. Colonias obtenidas en el agar AT

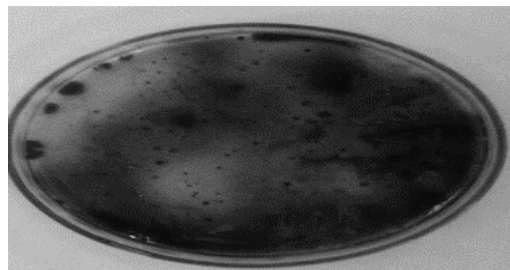


Figura 5. Colonias obtenidas en el agar SPS

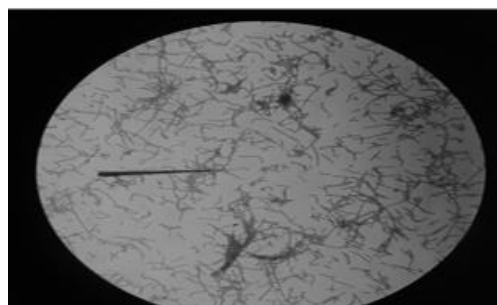


Figura 6. Morfología Bacilo Gram+

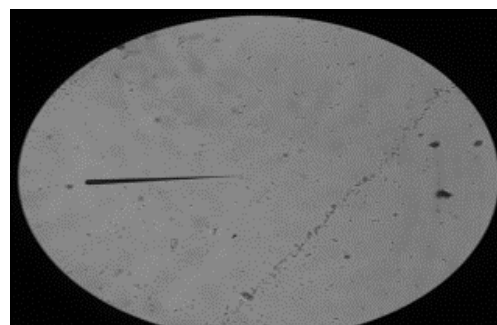


Figura 7. Morfología Coco Gram-

Las características morfológicas del cultivo puro se muestran en la tabla 2. Un resultado importante, es que, la bacteria aislada resultó negativa a la prueba de catalasa. Lo que indica que el microorganismo es anaerobio estricto (Forbes BA, 2002).

Características morfológicas y coloniales de las bacterias aisladas en medio de cultivo selectivo anaerobio, se muestran en las figuras 8 y 9.

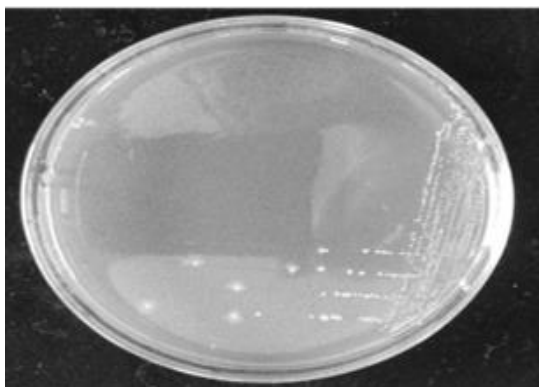


Figura 8. Morfología aislada en medio MB

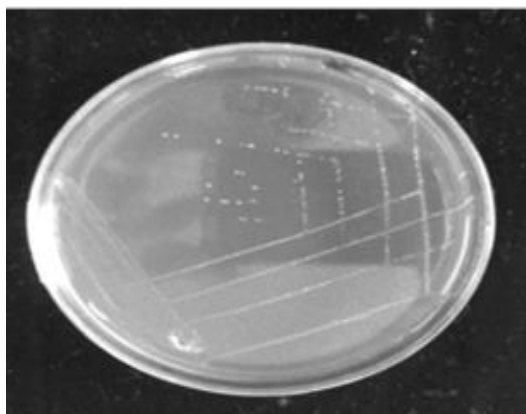


Figura 9. Morfología aislada en medio MC

Tabla 2. Características morfológicas de la bacteria aislada.

Morfología colonial	Características as Figura 7	Morfología colonial	Características as Figura 5
Forma	Irregular	Forma	Circular
Tamaño	Irregular	Tamaño	Pequeña
Luz transmitida	Traslúcida	Luz transmitida	Traslúcida

a		a	
Luz reflejada	Brillante	Luz reflejada	Brillante
Color	Blanco	Color	Blanco
Elevación	Plana	Elevación	Convexo
Superficie	Liso	Superficie	Liso
Borde	Irregular	Borde	Entero
Aspecto	Húmedo	Aspecto	Húmedo
Consistencia	Suave	Consistencia	Suave
Morfología celular	Bacilos	Morfología celular	Coco
Catalasa	Negativo	Catalasa	Negativo
Oxidasa	Negativo	Oxidasa	Negativo
Tinción Gram	Negativo	Tinción Gram	Positivo

Caracterización fenotípica

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para las bacterias, fueron contrastadas con las bioquímicas teóricas tomada de cepas de referencias *Methanococcus deltae* (ATCC) # 35294 y *Methanobacterium ruminantium* (ATCC) # 35063.

Según los resultados del aislamiento hecho de la muestras del bioreactor en estudio para tal fin, se aplicó un porcentaje de afinidad contrastando los resultados prácticos con los teóricos, obteniendo un perfil de afinidad de 88.8 % para *Methanobacterium spp*, el cual corresponde que corresponde a una alta tasa de identificación de este género, de igual forma

se obtuvo un porcentaje de 77.7 % para *Methanococcus spp*, lo que indica que probablemente se encuentre el microorganismo; es relevante aplicar más adelante pruebas de identificación moleculares, para establecer con exactitud la caracterización de los microorganismos en estudio.

Las cepas aisladas en esta investigación, se caracterizaron con los patrones de clasificación establecidos por el Laboratorio de Referencia para Anaerobios (Holdeman, 1997). para lo cual la morfología aislada en el medio AT arrojó un porcentaje de afinidad del 88,8% mostrando una alta tasa de identificación y por consiguiente para el medio SPS la bacteria aislada para este caso evidenció un alto porcentaje plenamente identificable con la cepa *Clostridium spp*, mostrando una afinidad del 100% por la misma, cabe aclarar que es necesario realizar estudios posteriores de identificación para ambos microorganismos aislados con el fin de verificar su identificación con más exactitud.

Tabla 3 - 4. Pruebas bioquímicas teóricas en contrastes con las prácticas para una presuntiva identificación de *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp*.

Prueba bioquímica	Prueba bioquímica Teórica según Cepa de Referencia ATTC	Resultados Prácticos
-------------------	---	----------------------

	35294	
Hemolisis	α-	α-
Catalasa	-	-
Oxidasa	-	-
TSI	A/A Gas v	A/A Gas
LIA	K/A	K/A
Citrato	+	-
Urea	-	-
RM -VP	+/-	+/-
Sulfuros	-	-
Indol	-	-
Motilidad	+/-	+
Glucosa	+	+
Xilosa	-	+
Fructosa	+	+
Cetrimide	-	-
XLD	-	-
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Prueba bioquímica	Prueba bioquímica Teórica según Cepa de Referencia ATTC 35294	Resultados Prácticos
Hemolisis	α-	α-
Catalasa	-	-
Oxidasa	-	-
TSI	A/A Gas v	A/A Gas
LIA	K/A	K/A
Citrato	+	+
Urea	-	-
RM -VP	+/-	+/-
Sulfuros	-	-
Indol	-	-
Motilidad	+/-	+
Glucosa	+	+
Xilosa	+	+
Fructosa	+	+
Cetrimide	-	-
XLD	-	-
Almidón	-	+
Caseína	-	+

Tabla 5-6. Pruebas bioquímicas teóricas en contrastes con las prácticas para una presuntiva identificación de las morfologías de mayor prevalencia en los medios AT Y SPS.

Medio AT

Prueba bioquímica	Prueba bioquímica Teórica según Cepa Bacteriana Ruminococcus aslibus	Resultados Prácticos
Hemolisis	α-	α-
Catalasa	-	-
Oxidasa	-	-
TSI	A/A Gas v	A/A Gas
LIA	K/A	K/A
Citrato	+	-
Urea	-	-
RM -VP	+/-	+/-
Sulfuros	-	-
Indol	-	-
Motilidad	+/-	+
Glucosa	+	+
Xilosa	+	+
Fructosa	+	+
Cetrimide	-	+
XLD	-	+
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Nitrato	-	-

Medio SPS

Prueba bioquímica	Prueba bioquímica Teórica según Cepa bacteriana Clostridium prefringes	Resultados Prácticos
Hemolisis	α-	α-
Catalasa	-	-
Oxidasa	-	-
TSI	A/A Gas v	A/A
LIA	-	-
Citrato	-	-
Urea	-	-
RM -VP	+/-	+/-
Sulfuros	+	+
Indol	-	-
Motilidad	+/-	+
Glucosa	+	+
Xilosa	+	+
Fructosa	+	+
Cetrimide	-	-
XLD	-	-
Almidón	+	+
Caseína	+	+
Nitrato	+	+

Producción de Metano.

Se realizó un muestreo donde se tuvieron en cuenta los primeros puntos de cada bioreactor de cada serie, luego a estas muestras se les aplico el mismo montaje anterior pero esta vez se les aplico diferentes temperaturas a cada muestra en las cuales se tuvieron en cuenta las siguientes 20 °C, 28 °C y 37 °C respectivamente y se les hizo un seguimiento cada 16 días. Es necesario aclarar que solo se evaluaron los primeros 16 días debido falta de tiempo, porque se hace necesario seguir haciendo seguimiento para así establecer un mejor análisis.

Una disminución en la formación de metano, y la rápida disgregación de la materia orgánica presente, indicaron, además, que la disminución en la producción de metano estaba relacionada con la temperatura a la que se expuso que para este caso es de 20 °C teniendo en cuenta que la población microbiana Metanogénica presente en el sistema productora de gas metano son de índole mesofilas, en la que su actividad metabólica comienza alrededor de 28 °C alcanzando su temperatura optima de 37 °C, como se aprecia en la figura 10.

A temperatura de 28 °C ya las bacterias metanogénicas comienzan su producción de metano debido a su temperatura óptima de su metabolismo, lo cual evidencio que en este rango de temperatura dicha población expreso los mejores resultados en cuanto a producción del biogás como lo nuestra la gráfica en comparación con las demás temperaturas. (Ver figura 11).

Para mejorar la remoción de la materia orgánica y por ende la producción de metano en el reactor anaerobio se trató de operar ésta producción de biogás a una temperatura de 37 °C (temperatura óptima para la reacción anaerobia) para lo cual arrojó valores menos significativos lo que nos indica que la variación con (IDAE, 2007) relación a las 2 primeras temperaturas 20 °C y 28 °C se explica debido a que se realizó bajo condiciones donde la población metanogena presente metabólicamente su ritmo estaba en etapa optima de crecimiento y con la suficiente concentración de sustrato, a lo que se refiere la temperatura de 37 °C que se suponía había de esperarse resultados más satisfactorios en cuanto a la producción de metano esta presenta una disminución a lo que se le podría atribuir a la reducción del sustrato. (Ver figura12).

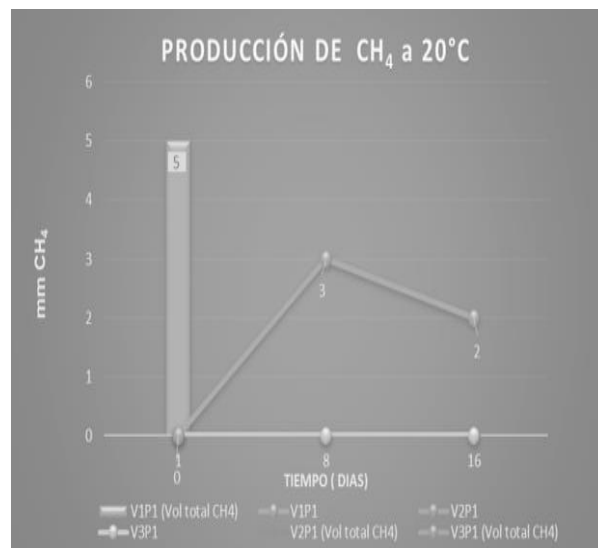


Figura 10. Producción de metano a temperatura de 20 °C

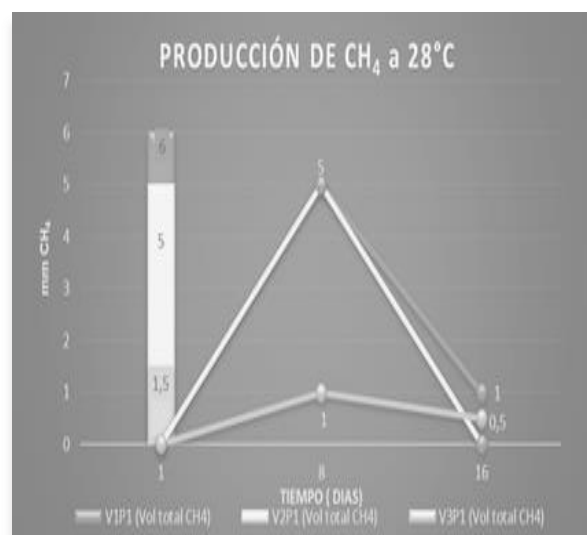


Figura 11 Producción de metano a temperatura de 28 °C.

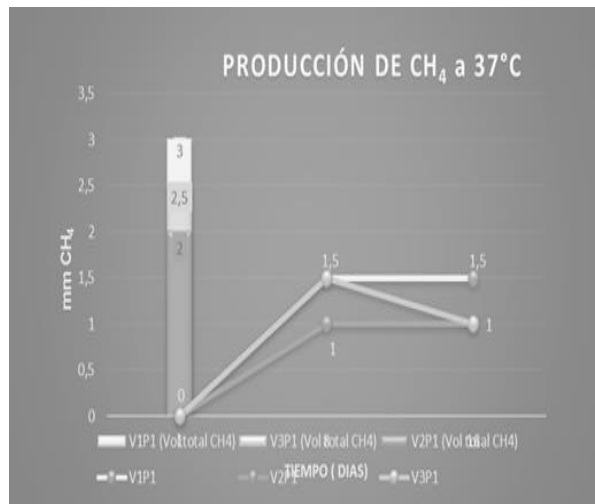


Figura 12 Producción de metano a temperatura de 37 °C

Finalmente se evaluó el porcentaje de producción del biogás, que para este caso la mayor eficiencia en cuanto a la velocidad del proceso de producción de CH₄ se observó a temperatura de 28 °C evidenciándose unos valores según los puntos de muestreo de alta carga orgánica (V1P1) de 0,375 cm³ CH₄/Día, medía carga orgánica (V2P1) de 0.31 cm³ CH₄/Día lo que nos indica que a este rango de temperatura la población metanogénica alcanza una mejor tasa de productividad del biogás en estudio, en comparación con la temperatura de 37 °C que establece que los microorganismos metanogenos son más activos y se produce biogás a una velocidad superior, según (Buren, 1976).

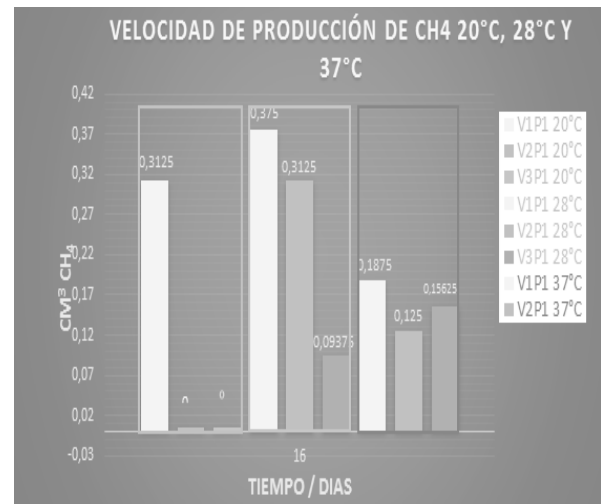


Figura 13. Velocidad de producción del biogás a diferentes temperaturas.

En general, la velocidad del proceso está limitada por la velocidad de la etapa más lenta, la cual depende de la composición de cada residuo. Para sustratos solubles, la fase limitante acostumbra a ser la metanogénesis, y para aumentar la velocidad la estrategia consiste en adoptar diseños que permitan una elevada concentración de microorganismos acetogénicos y metanogénicos en el reactor, como se evidencia en la figura 13 (IDAE, 2007).

CONCLUSIONES

Se aisló una población de bacterias identificadas como *Methanobacterium spp* y *Methanococcus spp* presuntivamente identificada con un porcentaje de fiabilidad del 88.8 % y 77.7 % a partir de las pruebas bioquímicas convencionales utilizadas para este estudio.

Los valores empleados en el medio de cultivo anaerobio y selectivo fueron establecidos en concentraciones de formato, 15g / 1000ml y líquido ruminal 300ml / 1L.

La velocidad de producción de metano para la población de Metanogénica presente en el sistema estableció que a temperatura de 28 °C en un tiempo total de 16 días esta presentó una mayor eficiencia del biogás a

diferencia de las otras temperaturas que para tal caso fueron de 20 °C y 37 °C. Estableciéndose como tiempo óptimo de desarrollo 15 días.

La presencia de una bacteria de tipo sulfato reductora como lo es el caso de *Clostridium spp*, con su capacidad de acidificar el medio puede inhibir el crecimiento de la biota metanogénica de interés, lo que hace necesario controlar la presencia de este tipo de microorganismo para que no dificulte el crecimiento de las bacterias metanogénicas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G.; Cabañes, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl* Acuña, F. (2002). Evaluación del sistema de tratamiento de aguas residuales de café en el beneficio de Coopronarajo R.L. *Instituto Tecnológico de Costa Rica.*, 65.

Acuña G. Paola A. (2008). Aislamiento e identificación de microorganismos del

género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D.C. NOVA - Publicación Científica EN CIENCIAS BIOMÉDICAS - ISSN:1794-2470 Vol.6 No. 10 JULIO - DICIEMBRE DE 2008:101-236

Ana Cláudia BARANA 2*,. (2000). CASSAVA WASTEWATER (MANIPUEIRA) TREATMENT USING A TWO-PHASE ANAEROBIC BIODIGESTOR 1 Aguas residuales de la

- yuca (Manipueira) uso de un Tratamiento de aguas residuales de la yuca en un digestor anaeróbico de dos fases. *Ciência y Tecnología Alimento*, No.2. Vol.20 pp 87-98.
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Medía*. Whachinton D,C: ASM-PRESS.
- B., R. (2000). *Biotecnología del Medio Ambiente: principios y aplicaciones*. Ed. Mc GrawHill.
- Balch E, W. S. (1976). New Approach to the cultivation of methanogenic bacteria: 2-mercaptoethanesulfonic acid (HS-COM) dependent grow of *Methanobacterium Ruminantium* in a pressurized atmosphere. . *Appl Environ Microbiol*, 32:781-791.
- Buren, A. v. (1976). *A Chinese Biogas Manual*,. 24-572.pd.
- Forbes BA, S. D. (2002). *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology*. . *Mosby*, 11a. ed. Pp 511-537. .
- Fredrickson JK, O. T. (2003). *Vida en las profundidades de la Tierra. Investigación y Ciencia* .
- Hernández, A. (2001). *Depuración y Desinfección de Aguas Residuales. Colegio de Caminos y Canales y Puertos*, p: 935-1013
- Holdeman. (1997). *The Prokaryotes Vol 4*.IDAE. (2007). Instituto Para la Diversificación y Ahorro de la Energía. *Biomasa Digestores Anerobios*, P30.
- Maldonado Isaac (1993). Alternativa de tratamiento de aguas residuales de matadero mediante filtro anaeróbico y discos biológicos rotatorios. Universidad Nacional de Colombia.
- Ormond DR, K. T. (2006). Washing methanogenic cells with the liquid fraction from a Mars soil simulant and water mixture. *J Microbiol Methods*. , 67:603-605.
- Ortiz J,M. (1992).Tratabilidad de aguas residuales de mataderos con filtros. *Revista Unal.edu.co*. Pag 24-35. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/ingeinvt/article/view/24694/25258>
- Smith PH, H. R. (1958). Isolation and characterization of *methanobacterium ruminantium* n. sp. . *J Bacteriol*. , 75:713-718.
- UPRM.EDU. (s.f.). *Fermentaciones y Metanogenesis*. Costa Rica.