

# CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE AGENTES METANOGÉNICOS SOBRE PRODUCTORES DE BIOMETANO EN CONDICIONES MESOFÍLICAS PARA LODOS DE TENERÍAS

Elizarrarás Rodríguez Polette (1), Serafín Muñoz Alma Hortensia (2), Magaña Pérez Pablo (3)

1 [Ing. Ambiental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [pol.90.er@gmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [sermuah@ugto.mx]

3 [Cámara de la Industria de Curtiduría del Estado de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [pablo.ma.pe@cicur.org]

## Resumen

En el presente trabajo se realizó la caracterización de microorganismos metanogénicos en muestras provenientes de lodos de tenerías. En paralelo, se llevó a cabo el diseño y operación de un biorreactor anaerobio en condiciones mesofílicas para la producción de biogás, utilizando las mismas muestras. Los resultados obtenidos mostraron la eficiencia de la producción de gases a una temperatura de  $34.9 \pm 0.1$  °C. Los microorganismos aislados pertenecen al dominio de las *Archaeobacteria* dentro del reino *Euryarchaeota*.

## Abstract

At this work was carried out the characterization of methanogenic microorganisms in samples from sludge of tanneries. In parallel, we also carried out the design and operation of an anaerobic bioreactor in mesophilic conditions biogas production, using the same samples. The results showed the efficiency of the production of gases at the temperature of  $34.9 \pm 0.1$  °C. The isolated microorganisms belong to the *Archaeobacteria* domain within the realm *Euryarchaeota*.

## Palabras Clave

Biodigestor; Bacterias Metanogénicas; Biogás; Lodos; Metanogénesis.

## INTRODUCCIÓN

Durante la última mitad del siglo XX, estudios e investigaciones han establecido y difundido el rol fundamental que las bacterias productoras de metano tienen en los procesos de degradación anaerobia en la naturaleza, donde se describen sistemáticamente las características de las especies dominantes de bacterias responsables de llevar a cabo este proceso. [1]

En varios ambientes anaerobios como el suelo y aguas residuales de diversos procesos industriales, la disponibilidad de los sustratos depende de la acción metabólica de otros microorganismos que degradan compuestos orgánicos a acetato, formiato, metilamina, metanol y metilmercaptano, entre otros, y estos son utilizados por las bacterias metanogénicas en la producción de metano. [2]

En cuanto a estas bacterias metanogénicas se conoce que son un grupo de microorganismos muy especiales porque a diferencia de otras bacterias, poseen cofactores únicos, como la coenzima M, HS-HTP y lípidos (isoprenil, gliceril y éteres). Las células contienen en su pared celular proteínas, glicoproteínas, o heteropolisacáridos y la secuencia de nucleótidos 16rRNA indica que las bacterias metanogénicas han evolucionado divergentemente de otras bacterias y estas bacterias han sido clasificadas en diferentes dominios tales como el *Archaeobacteria* y dentro del reino *Euryarchaeota*. (Blaut, 1979). [1]

Existen varios grupos de bacterias metanogénicas, que se diferencian entre sí por su morfología. Estas características se describen como cocos filamentosos y bacilos cortos anaerobios muy delicados, agrupados en cadenas, diplococos, tétradas y racimos. Pueden desarrollarse a temperaturas que van desde 38°C a 75°C y su afinidad al Gram es variable. [3] Su metabolismo se caracteriza por integrar las vías biosintéticas y bioenergéticas para la producción de ATP. En condiciones de ausencia de hidrógeno, oxidan compuestos para la obtención de electrones y crecen solamente en ambientes con un potencial redox de -300 mV. (Balch et al., 1979). [1]

Estas bacterias permiten ser empleadas en diferentes procesos biotecnológicos en sistemas anaerobios como componentes de biorreactores para la descomposición de materia orgánica proveniente de desechos de actividades antropogénicas, tales como: agricultura, ganadería, industria de alimentos, lodos proveniente de plantas de tratamiento de diferentes procesos, etc.

Los sistemas anaerobios desarrollan procesos fermentativos de los cuales se obtienen productos finales estables y una producción celular muy baja, alrededor del 3% de la materia orgánica presente en el agua residual es convertida en masa celular y el 97% restante es convertido por catabolismo en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> como productos finales estables. [4]

La metanogénesis es una actividad metabólica importante y constante en los ecosistemas, el metano liberado contribuye al problema del cambio climático global actual y comprende la última fase en la descomposición anaeróbica de muchos de compuestos orgánicos complejos.

### La tenería en nuestra región

La industria curtidora representa un motor básico para la economía de León, Guanajuato. En esta ciudad se procesa el 70% de la producción peletera del país, que ocupa al 60% de la mano de obra local. El estado de Guanajuato surte de cueros y pieles y cubre el 60% de la producción nacional del calzado, además de significar 13% de las exportaciones zapateras mexicanas. En esta entidad se encuentran cerca de 721 tenerías o curtidorías. [5]

Para tal actividad el uso de grandes volúmenes de agua y de los extractos curtientes vegetales o minerales (sales de Cr) es indispensable. Debido a la gran cantidad y baja biodegradabilidad de estos compuestos químicos, el tratamiento de las aguas residuales de las tenerías representa un problema tecnológico y ambiental considerable (Di Laconi et al. 2002). La aplicación de los procesos basados en el tratamiento biológico, como la digestión anaerobia, se han empleado para tratar estos efluentes después del tratamiento fisicoquímico (Tsotsos 1986); la tendencia hoy día consiste en el tratamiento directo de estos efluentes por

unidades biológicas de alta carga: reactores anaerobios (López et al. 2002). [6]

En el 2012 la Universidad de Guanajuato estableció un convenio con la Cámara de la Industria de Curtiduría del Estado de Guanajuato (CICUR) para la transferencia de tecnología, en un proyecto que consiste en el tratamiento de los lodos que genera esta actividad industrial en la ciudad de León, Guanajuato. En dicho convenio la Universidad otorgo los derechos de un proyecto científico para construir un sistema de biodigestores en el Parque de Lodos de la CICUR, con el objetivo de convertir los residuos sólidos de las industrias curtidoras en biogás para generar energía eléctrica a bajo costo y con alto rendimiento. [7]

Es por eso que, teniendo en cuenta la importancia de estos microorganismos en los procesos de bioremediación y para la conservación del medio ambiente y el aprovechamiento y un mayor rendimiento de producción de CH<sub>4</sub>, este trabajo planteo como objetivo el aislamiento y posterior caracterización de los géneros de bacterias metanogénicas presentes en lodos de tenerías de dicha planta de tratamiento de estos, teniendo como antecedente la utilización de esta muestra para la producción de biogás, metano principalmente, en el reactor anaerobio instalado en esta planta. Cabe mencionarse que las muestras a analizar fueron la entrada y la salida de dicho reactor en condiciones mesofílicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología a seguir para conseguir el aislamiento e identificación de los agentes metanogénicos presentes en las muestras fue la siguiente:

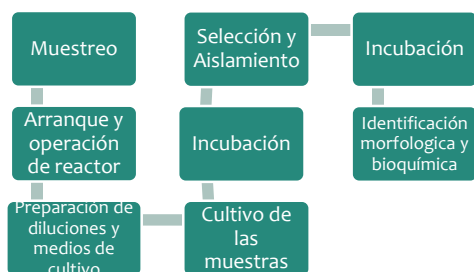


FIGURA 1: Diagrama de metodología empleada

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el arranque del reactor se llevó a cabo la alimentación con las siguientes condiciones: 5 litros de muestra de Entrada al digestor de lodos de tenería y 5 litros de muestra de Salida del digestor de lodos de tenería, un pH de 7.08 para la muestra de Entrada y un pH de 8.08 para la muestra de Salida. La mezcla de estas dos muestras arroja un pH de 7.4 y una temperatura de 24.4°C. Se tomó en cuenta observaciones como la temperatura ambiente y si los días estaban nublados, soleados, etc. En el arranque y operación del reactor se presentaron los siguientes resultados:

FECHA	DIA	ph	TEMPERATURA (°C)	VOLUMEN (ml)	PRENDE	TIEMPO
08/06/2015	0	7.4	34.4	0	NO	t0
09/06/2015	1	7.24	34.7	0	NO	t24
10/06/2015	2	7.14	33.9	0	NO	t48
11/06/2015	3	7.09	34.6	0	NO	t72
12/06/2015	4	6.96	34.7	300	NO	t96
16/06/2015	8	6.9	34.9	2445	NO	t192
17/06/2015	9	6.81	35.1	1475	NO	t216
18/06/2015	10	6.78	36.7	0	NO	t240
22/06/2015	14	6.93	31.9	850	NO	t336
23/06/2015	15	6.98	32.3	840	NO	t360
24/06/2015	16	6.98	31.9	0	NO	t384
25/06/2015	17	6.91	33	0	NO	t408
29/06/2015	21	6.93	32.3	960	NO	t504
30/06/2015	22	6.84	32	0	NO	t528
01/07/2015	23	6.85	33.1	455	NO	t552
02/07/2015	24	6.94	32.4	170	NO	t576
03/07/2015	25	6.97	32.2	0	NO	t600
08/07/2015	30	7.33	32.4	250	NO	t720
10/07/2015	32	7.17	32.9	120	NO	t768
14/07/2015	36	7.09	33.2	785	NO	t864

TABLA 1: Registro del monitoreo del reactor

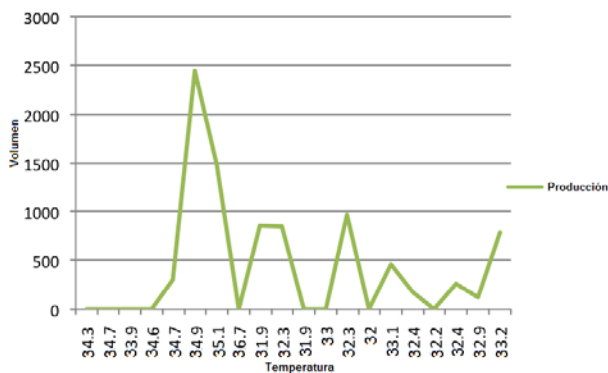
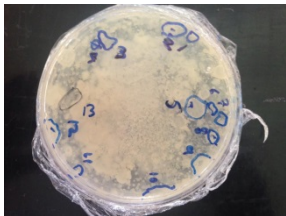


FIGURA 2: Gráfica de producción de biogás en el reactor

Con esto podemos inferir que la producción se ve favorable a una mayor temperatura, aunque en estos 36 días de operación no se logró obtener metano, obteniendo otros gases como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S y O<sub>2</sub> principalmente.

Para el aislamiento de los microorganismos, se cultivaron dos muestras: Entrada y Salida del reactor y se prepararon dos diluciones para cada una, 1:100 y 1:1000 y se dejaron incubar por 24 horas a 37°C en medio de cultivo Estándar. Se obtuvo el siguiente crecimiento de las 4 cajas Petri:

E 1:100



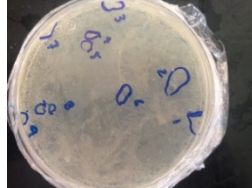
S 1:100



E 1:1000

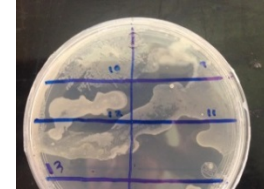
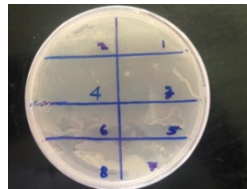


S 1:1000

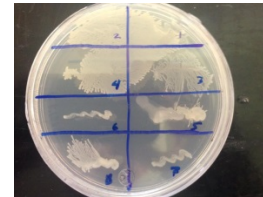


Posteriormente se aislaron los microorganismos que presentaron crecimiento en estas, dividiendo las cajas Petri en 8 secciones y se dejaron inocular por 8 horas, este tiempo fue el óptimo ya que las bacterias presentaron una cinética de crecimiento muy rápida, primero se probó a las 20 horas, a las 16 horas, a las 12 horas y con 8 horas el aislamiento fue el más favorable, resultando lo siguiente:

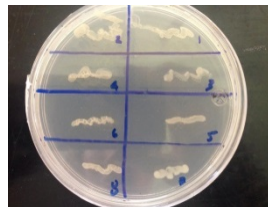
E 1:100



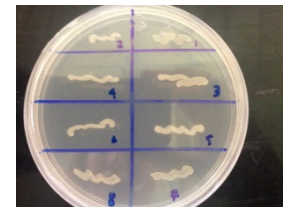
E 1:1000



S 1:100

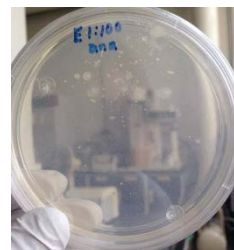


S 1:1000



Con fines cualitativos se inocularon las muestras en condiciones anaerobias, introduciendo primero en las cajas Petri la muestra y posteriormente el cultivo Agar Estándar. Aquellas que crecieron en la superficie se supuso que eran aerobias y aquellas que crecieron en la parte baja de la caja se presume son anaerobias.

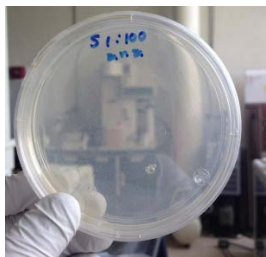
E 1:100 ana



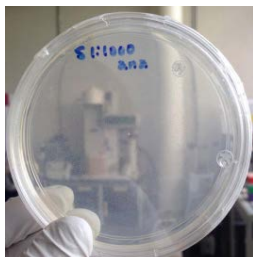
E 1:1000 ana



S 1:100 ana



S 1:1000 ana



Para la identificación morfológica y fenotípica de los microorganismos aislados, se observaron estos al microscopio y en base a referencias se concluyó que se tratan de Gram negativas y por su morfología, características físicas generales y dichas referencias bibliográficas pudieran ser del dominio Archaea, esto se confirmara con otro trabajo realizado al par mediante biología molecular.

## CONCLUSIONES

Al par de este trabajo, se está llevando a cabo otro para la identificación por biología molecular de la especie a la que pertenecen dichas Archaeobacterias. Como trabajo a futuro se buscará optimizar las condiciones del microorganismo para aumentar la producción de biogás en el reactor anaerobio ya diseñado.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, al M. en I. Santiago Gutiérrez Vargas, por su apoyo y oportunidad de colaboración, a la Dra. Ma. Fabiola León Galván y su grupo interdisciplinario de trabajo de la división de Ciencias de la Vida de la UG por permitirnos usar de sus instalaciones, a la Dra. Alma Hortensia Serafín Muñoz por su credibilidad y apoyo incondicional y a Blanca Eugenia Cuevas Pardo por su valiosa colaboración durante todo el trabajo.

## REFERENCIAS

### Libro:

[1] Balch, W. E., Blaut, P., Woese, C. R. & Wolfe, R. S., (1979). Methanogens: reevaluation of a unique group. Philadelphia, PA: Microbiol Rew

[2] Ibarra Arias, J. (2006). Aislamiento de bacterias anaerobias hidrogenotróficas en el tracto gastrointestinal del avestruz. Colima, México: Tesis para obtener el grado Maestro en Ciencias.

[4] Noyola, A. (1997). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. Foro Internacional. Comparación de dos tecnologías en Aguas residuales domésticas para municipalidades. Medellín, Colombia: Foro Internacional.

[5] Escárcega Cruz, S. (2001). Biodegradación de taninos de curtidurías mediante cultivos de *Aspergillus niger*. México, D. F.: Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología.

### Artículo:

[6] Di Laconi, C., Di Pinto, A., Lopez, A., Passino, E., Ramadori, R., (2002). Combined chemical and biological degradation of tannery wastewater by a periodic submerged filter (SBBR). *Water Research* 36: 2205-2214.

Lopez, J., Omil, F., y Méndez, R., (2002). Anaerobic treatment of natural tannin extracts in UASB reactors. VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaerobia. Yucatán, México. 652 p.

Tsotsos, D., (1986). Tanneries: a short survey of the methods applied for wastewater treatment. *Water Science and Technology* 18:69-76.

[3] Acuña Gonzales, P. A., Ángel García, L. S., Borray Montoya, E., Corrales, L. C., Sánchez, L. G., (2008). Aislamiento e identificación del género *Methanococcus* y *Methanobacterium* de cuatro fuentes de Bogotá D. C. NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 6(10), 157-158.

### Página Web

[7] Igeteo Redacción. (2014). Sector Curtidor Nacional Reconoce Proyecto de UG con el Premio "Saint Jordi". Recuperado de <http://www.igeteomx.info/2014/12/sector-curtidor-nacional-reconoce-proyecto-de-ug-con-el-premio-saint-jordi/#sthash.5OHOuhXh.dpuf>