

## Digestión anaerobia de vinazas de vino: determinación de la biomasa viable

R. Solera, L.I. Romero y D. Sales

Dpto. de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Universidad de Cádiz

### Summary

In this paper, we studied the thermophilic anaerobic treatment of vinasses. The viable bacterial population was quantified by solid medium plating techniques, employing an anaerobic chamber for spreading into plates and subsequent incubation of inoculated plates. This technique has been applied to the measurement of the microbial population contained in both single and two-stage, laboratory-scale reactors. In the single-stage process the main reaction steps-acidogenesis and methanogenesis-take place in the same reactor, while in the two-stage process they take place in separate reactors.

### Introducción

En este estudio se ha determinado la biomasa viable responsable del proceso de depuración de vertidos de alta carga orgánica: vinazas. Este tema es especialmente importante en España, que se caracteriza económicamente por una fuerte implantación del sector agroalimentario (industrias vitivinícolas, azucareras, conserveras, etc.) que generan fundamentalmente residuos con elevado contenido en materia orgánica. Las vinazas, vertidos procedentes de destilerías vnicas, son especialmente importantes por su alto poder contaminante (20-200 gDQO/L), su acusado carácter ácido (pH 3-3,5) y sus elevados volúmenes de producción a escala nacional.

La digestión anaerobia es un proceso de degradación microbiológico en el que la materia orgánica se transforma en dióxido de carbono y metano, en ausencia de oxígeno, mediante la acción coordinada e interdependiente de un conjunto de poblaciones bacterianas con metabolismos diferentes. Tradicionalmente se ha considerado un modelo de digestión simplificado en dos etapas: acidogénica y metanogénica. Los microorganismos responsables de estas dos etapas son muy diferentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, velocidades de crecimiento y consumo de sustrato, requerimientos de pH, y en su capacidad para soportar cambios medioambientales.

Las técnicas de recuento en placa, para determinar la biomasa viable se puede realizar en cabina de anaerobios, que crea un ambiente anaerobio indispensable para el crecimiento de estos microorganismos. La principal ventaja de la utilización de la cabina de anaerobio es que permite la preparación del medio de cultivo, siembra e incubación en ausencia de oxígeno. Además se consigue un crecimiento mucho más rápido y colonias de mayor tamaño en cultivos puros de metanógenas que con los otros procedimientos.

La combinación del crecimiento en placa y observación de la fluorescencia permite la detección más temprana de bacterias metanógenas que por métodos tradicionales. Edwards y McBride (1974) utilizaron la capacidad autofluorescente de las metanógenas para la identificación de las colonias de estas bacterias mediante la exposición a luz ultravioleta. Así, estos autores comprobaron que las colonias de metanógenas presentaban una fluorescencia verde azulada fácil de diferenciar de la fluorescencia amarillo blanquecino correspondiente a las colonias de otras bacterias.

Cualquier procedimiento empleado en el conteo de viables siempre es selectivo para ciertos microorganismos debido a la composición del medio de cultivo, las condiciones y el periodo de incubación. Este grado de selectividad es un inconveniente para la estimación del número total de microorganismos viables dentro del

digestor, por la dificultad de seleccionar unas condiciones idóneas de crecimiento para toda la población bacteriana que lo integra, debido, fundamentalmente, a la gran heterogeneidad de la misma. Sin embargo, y por la misma razón, representa una ventaja a la hora de seleccionar un grupo determinado de microorganismos (Atlas, 1993).

En este trabajo se ha obtenido un protocolo para la determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios termofílicos de vinazas de vino. Se han utilizado reactores anaerobios termofílicos de tanque agitado de una y dos etapas, operando a distintos tiempos hidráulicos de retención. En los reactores de una etapa, la acidogénesis y metanogénesis tienen lugar en el mismo reactor, y en los sistemas de dos etapas, éstas tienen lugar en reactores separados conectados en serie. Si bien el protocolo de realización propuesto determina la biomasa, fundamentalmente, acidogénica se proponen algunas pautas de realización para la determinación de la biomasa metanogénica, al tiempo que se ha constatado la dificultad de determinación de esta biomasa por procedimientos de recuento en placa.

## Material y métodos

### Recuento en placa

Se describe, en primer lugar, el equipo utilizado, así como la composición del medio de cultivo empleado y de la solución de agente reductor, finalizando con el procedimiento de siembra y las condiciones de incubación.

### Cabina de anaerobios

Se ha utilizado una cabina de anaerobios Forma Scientific, Inc. modelo 1029. El equipo consta de tres zonas claramente diferenciadas: zona de



Figura 1

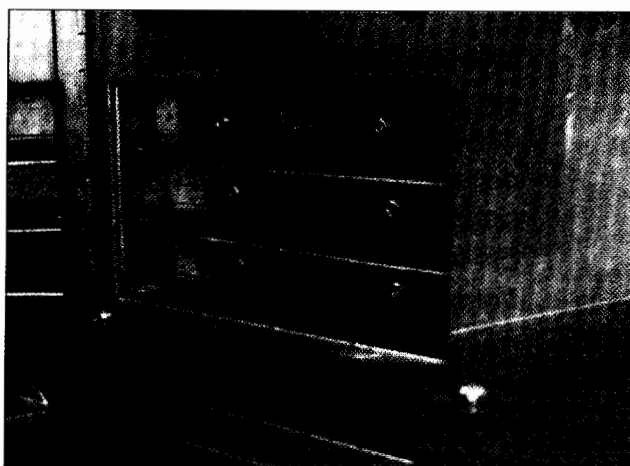


Figura 2

**En este trabajo se ha obtenido un protocolo para la determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios termofílicos de vinazas de vino. Se han utilizado reactores anaerobios termofílicos de tanque agitado de una y dos etapas, operando a distintos tiempos hidráulicos de retención**

trabajo o cámara anaerobia; zona de transferencia o precámara y panel de control. En la Figura 1 se recoge una fotografía de este equipo.

La zona de trabajo o cámara ana-

erobia está equipada con un frontal de vinilo transparente y flexible a través del que se visualiza el interior y se facilita la manipulación en el interior mediante un par de guantes incorporados al mismo. Posee una capacidad de 670 L y sus dimensiones exteriores son: 153,5 cm x 76,2 cm x 78,7 cm. Para conseguir la atmósfera anaerobia necesaria en el interior del sistema, la cámara presenta una conexión a una fuente de gas anaerobio, compuesto por la siguiente mezcla de gases: nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno en composición porcentual 85: 10: 5, respectivamente. La presión de gas anaerobio en el interior de la cámara es ligeramente positiva (+ 0,5 atm) de forma que impida la entrada de oxígeno del exterior ante posibles roturas o desperfectos en el sellado. En cualquier caso, para prevenir entradas eventuales de oxígeno en la cámara, las trazas de oxígeno son eliminadas continuamente mediante un sistema de filtración del aire com-

puesto de un filtro de carbón activo-catalizador de paladio-desecante, que se ubica en el interior de esta zona, justo debajo de un ventilador que remueve continuamente el gas del interior de la cámara, haciéndolo pasar a través de estos tres componentes. Un detalle de este sistema de filtración se recoge en la Figura 2 del presente trabajo. Con este sistema el aire es continuamente filtrado a través de estos recipientes de forma que el filtro de carbón activo retiene las trazas de gas sulfhídrico, el catalizador de paladio retiene las trazas de oxígeno y el desecante absorbe el agua formada, como consecuencia tanto de la reducción de oxígeno a agua, catalizada por el paladio, como por la evaporación de los medios de cultivo.

En el interior de la cámara anaerobia, construido en su pared posterior y completamente aislado, se encuentra un incubador cuyas

dimensiones son: 44,5 cm x 55,9 cm x 25,4 cm. El hecho de que el incubador se encuentre totalmente aislado permite regular la temperatura de incubación sin que ésta afecte excesivamente a la zona de trabajo, evitándose de esta forma, la desecación del medio de cultivo almacenado en la cámara. En la Figura 3 se muestra un detalle del incubador. La temperatura del incubador se mantiene, mediante un termostato de seguridad, con una precisión de  $\pm 1^\circ\text{C}$ . El valor máximo de temperatura permitida es  $70^\circ\text{C}$ .

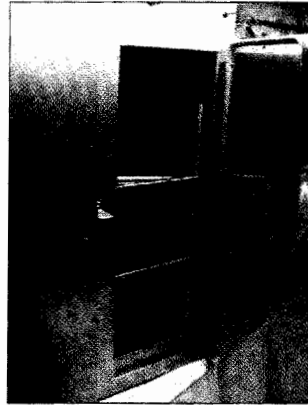


Figura 3

La zona de transferencia o precámara se localiza a la derecha de la zona de trabajo. Es un pequeño recinto que consta de dos puertas; una de las puertas comunica con el exterior y la otra con la zona de trabajo. Su capacidad es de 39 L y sus dimensiones son: 26,9 cm x 29 cm x 50 cm. Esta zona del equipo permite intercambiar material entre el interior y el exterior sin que la cámara se contamine con oxígeno (ver Figura 4).

Localizado en la parte superior de la puerta de acceso a la precámara, se encuentra el panel de control, mediante el que se controlan todas las funciones del equipo: mantenimiento de la presión de gas anaerobio en el interior, realización de las operaciones de intercambio de forma automática y manual, así como la selección y control de la temperatura del incubador.

#### Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado se basa en la descrita por Maestrojuan (1987). Los compuestos básicos para el desarrollo de las bacterias anaerobias, utilizados en la elaboración de los medios de cultivo, se han clasificado, en función de su potencial reductor y su volatilidad, en los siguientes grupos: compuestos no volátiles y no reductores; compuestos no volátiles y con poder reductor; compuestos volátiles y reductores; y solución de agente reductor

**Los equipos utilizados a escala de laboratorio se corresponden con reactores de tanque agitado sin recirculación de biomasa. En este tipo de reactor el tiempo hidráulico de retención (THR) coincide con el tiempo de retención de sólidos en el sistema**

Las mencionadas características determinan el orden de su adición en la preparación del medio según Maestrojuan (1987), así, para eliminar el oxígeno disuelto en el medio, se mantiene el agua en ebullición y se gasea con nitrógeno y, a continuación se enfría gaseando con una mezcla de  $\text{N}_2$  y  $\text{CO}_2$  (70:30). Los compuestos no volátiles se añaden durante la ebullición y los compuestos reductores

cuando el agua carece de oxígeno disuelto.

La composición por litro de solución es la siguiente:

**Compuestos no volátiles y no reductores.**- Los componentes no volátiles y no reductores se incluyen, a su vez, en tres soluciones (soluciones A, B y mineral). *Solución A:*  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : 100 g;  $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 10 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 10 g. *Solución B:*  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : 200 g. *Solución Mineral:* Ácido nitriloacético: 1,280 g;  $\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 1,350 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 0,100 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0,024 g;  $\text{ZnCl}_2$  anhidro: 0,100 g;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,025 g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : 0,010g;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,024 g;  $\text{NaCl}$ : 1,000g;  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0,026 g;  $\text{Ni Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0,120 g.

**Compuestos no volátiles y con poder reductor.**- Extracto de levadura: 2 g; Triptona: 2 g; Agar: 20g; Resazurina: 1 mg.

**Compuestos volátiles y reductores** - Hidrocloruro de cisteína: 0,5;  $\text{NaHCO}_3$ : 2,8; glucosa (medio de cultivo para el crecimiento de acidogénicas): 4,5; acetato sódico (medio de cultivo para el crecimiento de metanogénicas): 2.

Solución de agente reductor.- Este compuesto, junto con el hidrocloruro de cisteína, proporciona el bajo potencial reductor necesario para el crecimiento de las bacterias metanógenas. Se añade 0,6 g de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  por cada 10 mL de solución.

Además en el caso del crecimiento de la biomasa metanogénica se utilizaron las siguientes fuentes de carbono más adecuada para ésta: acetato (acetoclásticas), borohidruro de sodio (utilizadoras de hidrógeno) y efluente acidogénico filtrado por  $0,22 \mu\text{m}$  (11 gDQO/L).

#### Procedimiento de siembra y condiciones de incubación

Todo el proceso de siembra e incubación se desarrolla en el interior de la cabina de anaerobios. La muestra se



Figura 4

homogeneiza mediante agitación en un vortex Heidolph Reax 2000, durante 20 segundos. Las placas se inoculan con 0,1 mL de las diluciones adecuadas. Se seleccionaron, de la serie de diluciones, tres diluciones consecutivas y tres placas por dilución. Una vez finalizada la siembra, las placas se introducen en el incubador de la propia cabina y son incubadas, en posición invertida a  $55^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  de temperatura, durante un periodo mínimo de 48 horas para el crecimiento de bacterias acidogénicas; el periodo de incubación mínimo se aumenta en los ensayos de crecimiento de bacterias metanogénicas.

## Equipo experimental y condiciones de operación

Los equipos utilizados a escala de laboratorio se corresponden con reactores de tanque agitado sin recirculación de biomasa. En este tipo de reactor el tiempo hidráulico de retención (THR) coincide con el tiempo de retención de sólidos en el sistema. Los reactores monofase operaron a dos THR: 4 y 10 días; en el sistema de fases separadas se impuso un THR de 4 días en ambas fases. En la Figura 5 se puede observar un esquema del equipo utilizado, que consta de un cuerpo central de forma cilíndrica con una altura de 30 cm, que constituye el reactor anaerobio propiamente dicho. La capacidad total de esta unidad es de 5 litros, con un volumen útil de 4,7 litros en las condiciones experimentales seleccionadas. El cuerpo del reactor se encuentra inmerso en un baño de agua que se mantiene a la temperatura de trabajo ( $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) mediante un termostato de inmersión (marca Selecta, modelo Tectra 100). La homogeneización del medio en el interior del reactor se consigue mediante un dispositivo de agitación magnética. Un gasómetro, constituido por un recipiente de 5 litros de volumen, inicialmente lleno con agua. El gasómetro, conectado a la cabeza del reactor, permite la cuantificación del volumen generado de biogas en cada instante a partir del volumen equivalente de agua desplazada.

Los reactores de laboratorio se ali-

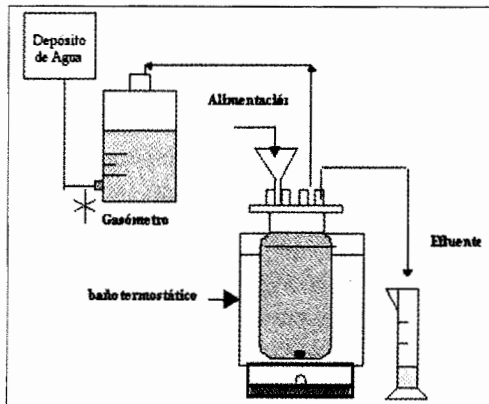


Figura 5. Esquema del reactor de tanque agitado utilizado en los ensayos

**Todas las determinaciones analíticas aplicadas al seguimiento y control de los parámetros del proceso de digestión anaerobia se han realizado según se describen en los "Métodos Normalizados" (APHA, 1990). Se analizaron pH y DQO en las muestras líquidas de efluente e influente. Se determinó la DQO mediante dicromatometría. Se determinó el volumen de biogas producido mediante desplazamiento de agua en el gasómetro y su composición ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) por cromatografía (Nebot, 1995)**

mentaron con vinazas de vino procedente de una destilería de alcohol vínicu ubicada en Tomelloso (Ciudad Real), la cual era almacenada y congelada hasta su utilización. Las alimentaciones se diluían con agua destilada para obtener la concentración utilizada en los ensayos (15 gDQO/L). En general las vinazas muestran una relación adecuada entre los diferentes macro y micro-nutrientes con una relación DQO:N:P favorable para un tratamiento biológico (Sales, 1982). Dado el carácter ácido de la vinaza, previamente a su introducción en los reactores se realizaba una corrección de pH

de la alimentación: se alcalinizaba hasta 8-8,5 con una solución de NaOH concentrada.

## Métodos analíticos

Todas las determinaciones analíticas aplicadas al seguimiento y control de los parámetros del proceso de digestión anaerobia se han realizado según se describen en los "Métodos Normalizados" (APHA, 1990). Se analizaron pH y DQO en las muestras líquidas de efluente e influente. Se determinó la DQO mediante dicromatometría. Se determinó el volumen de biogas producido mediante desplazamiento de agua en el gasómetro y su composición ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ ) por cromatografía (Nebot, 1995).

## Plan de trabajo

**Puesta a punto de la cabina de anaerobios.**- Las operaciones y ensayos realizados en relación con este equipo han sido el proceso de arranque y puesta en funcionamiento, la optimización de la operación de transferencia y la definición de las condiciones de operación necesarias para el mantenimiento de la atmósfera anaerobia.

El objetivo del procedimiento de arranque y puesta en funcionamiento del equipo es reemplazar todo el gas atmosférico del interior de la cabina, particularmente el oxígeno, por una mezcla especial de gas anaerobio (80%  $\text{N}_2$ , 15%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{H}_2$ ). La duración del proceso prevista en el manual de utilización del equipo (Forma Scientific, Inc.) es de tres a cuatro horas. Se comienza inyectando nitrógeno en la cámara y, simultáneamente, se realiza un vacío para reemplazar el aire atmosférico del interior del sistema. Este ciclo se debe repetir varias veces hasta que todo el gas atmosférico del interior es reemplazado por gas nitrógeno y por gas anaerobio en los últimos ciclos. El proceso de arranque finaliza activando el sistema de filtración de aire de la cámara, de tal forma que las trazas de oxígeno que queden en el interior sean eliminadas por el catali-

---

**El mantenimiento del ambiente anaerobio en la zona de trabajo depende fundamentalmente de los siguientes factores:**  
**frecuencia de regeneración del catalizador de paladio;**  
**frecuencia de regeneración del desecante;** **contenido de humedad de la cámara;**  
**renovación del gas anaerobio en el interior**

---

zador de paladio. Como comprobación, se introduce en la cámara un indicador de anaerobiosis que, en este trabajo, ha sido una tira BBL de azul de metileno. En esta etapa experimental se realizaron una serie de ensayos encaminados a fijar el número de ciclos necesarios para alcanzar las condiciones anaerobias adecuadas a las exigencias de los microorganismos anaerobios estrictos. Estos ensayos se realizaron aumentando, progresivamente, los ciclos de purga con nitrógeno y gas anaerobio.

**La operación de transferencia** se realiza para que durante el proceso de introducción/extracción de objetos en la cabina no se produzca contaminación con gas atmosférico en el interior de la cámara anaerobia. Se realizaron una serie de ensayos de cara a establecer el número de repeticiones del ciclo de transferencia necesarias para alcanzar las condiciones adecuadas de anaerobiosis en la zona de intercambio y, por tanto, conseguir que el ambiente anóxico de la cámara se mantenga continuamente.

El mantenimiento del ambiente anaerobio en la zona de trabajo depende fundamentalmente de los siguientes factores: frecuencia de regeneración del catalizador de paladio; frecuencia de regeneración del desecante; contenido de humedad de la cámara; renovación del gas anaerobio en el interior.

El catalizador de paladio y el desecante deben ser regenerados conjuntamente, mediante calentamiento a 160 °C durante 2 horas. La frecuencia de regeneración está directamente relacionada con la cantidad de material y contenido en humedad del mismo, así como con la cantidad de medio de cultivo que se introduce en la cámara. Inicialmente, se comenzó con una frecuencia de regeneración semanal, aumentándose la misma a medida que se intensificaba la utilización de la cabina.

Debido a que el mantenimiento de las condiciones anóxicas en la cámara conlleva, necesariamente, un acusado grado de sequedad y debido a que éste se relaciona directamente con el contenido y el tipo de material y medios de cultivo en el interior, se consideró necesario realizar un ensayo para analizar el efecto del aumento del contenido de desecante en el interior de la cámara y la frecuencia de regeneración del mismo.

La renovación del gas anaerobio del interior de la cámara se relaciona tanto con el sistema de filtración interno (filtro -catalizador - desecante), como con la frecuencia de realización de la operación de transferencia ya que en ésta se produce un paso del gas anaerobio de la cámara a la zona de transferencia que debe ser repuesto en aquella con el procedente de la fuente de suministro para el mantenimiento de la presión. Por ello, se realizó una prueba aumentando la frecuencia de renovación del gas anaerobio del interior de la cámara por desplazamiento desde ésta a la zona de transferencia.

**Medios de cultivo.**- Actualmente existe discrepancia sobre la prepara-

ción de los medios de cultivos, según sea en condiciones aerobias (Downs, 1990) o anaerobias (Maestrojuan, 1987) en función de las condiciones que prevalezcan durante el proceso de preparación: atmósfera anaerobia, aerobia/anaerobia o aerobia. En este sentido se realizó un ensayo comparativo en el que se procede a estudiar la influencia de las condiciones que prevalecen durante la preparación del medio sobre el crecimiento, realizando una prueba bajo condiciones anaerobias y otra bajo condiciones aerobias y anaerobias. En el ensayo realizado en condiciones aerobias, la adición de los diferentes constituyentes del medio se realiza en atmósfera aerobia (excepto la solución de agente reductor cuya preparación se realiza de forma anaerobia) y, una vez el medio es esterilizado, se introduce en la cabina de anaerobios en donde se le añade la solución de agente reductor y se vierte en las placas Petri.

A partir de los ensayos anteriormente descritos **se propone un protocolo para la determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios**

**Optimización de las condiciones de crecimiento de las bacterias acidogénicas: influencia del pH.**- Con la finalidad de conseguir un crecimiento óptimo se estudiaron algunos aspectos relacionados con los requerimientos de pH del medio. Por otra parte, el valor final de pH del medio de cultivo está condicionado principalmente por la adición de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$  que lo alcaliniza, de tal forma que el pH final del medio se encuentra en un rango comprendido entre 8,0-8,8. Este pH es demasiado alcalino para la microbiota acidogénica, por ello, se realizó un ensayo a diferentes pH. Así, se prepararon tres medios de cultivo: dos de ellos se acidifican ligeramente con fosfórico concentrado y el tercero se mantiene como control (pH 7,31), resultando, después de esterilizar y añadir la solución de  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ , los siguientes pH 5,81; 7,13 y 8,11 (control).

A continuación se estudió la **utilización de diferentes fuentes de carbono** más propias de otras poblacio-

---

**Se propone un protocolo para la determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios**

---

nes presentes en los digestores (acetógenas y metanógenas acetoclásticas) y se comparó este crecimiento con el contenido utilizando glucosa y sin añadir ninguna fuente de carbono.

## **Crecimiento de metanógenas.-**

Se realizó un primer ensayo con el medio de cultivo descrito y las fuentes de carbono mencionadas anteriormente para estas bacterias. Para este ensayo se utilizaron como inóculos los efluentes del digestor monoetapa (THR 10 días) y del reactor metanogénico de fases separadas.

## **Ensayo complementario: prueba de sensibilidad a antibióticos.-**

Debido a que las bacterias acidogénicas son de crecimiento más rápido y menos estrictas en los requerimientos ambientales y nutricionales que las metanógenas, se planteó conseguir ausencia de crecimiento de la población acidogénica para ello se realizó una prueba de sensibilidad a antibióticos de tal forma que su adición al medio de cultivo específico para metanógenas, inhibiese el crecimiento de las primeras. Las bacterias acidogénicas son eubacterias y, por tanto, presentan sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos; las metanógenas son arqueobacterias por lo que son resistentes a estos antibióticos (Archer, 1984).

No obstante, la sensibilidad de las eubacterias a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos no es universal, sino que depende del género bacteriano. Considerando la heterogeneidad de la población acidogénica existente en los digestores, es muy probable que se presente resistencia a algunos de estos antibióticos. Por ello, se realizó una prueba de sensibilidad a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos más utilizados y en las concentraciones que se indican expresadas en  $\mu\text{g}$  por litro: Ampicilina: >16; Sulfabactimicina: 8; Cefazolina: >16; Cefotaxime: 8; Cefoxitina: >16; Ceftazidima: >16; Cefuroxima: >16.

El medio de cultivo, utilizado en este ensayo, es Agar-Sangre (carnero 5%) de la casa comercial Merck. La composición básica por litro de medio Agar-Sangre es la siguiente: peptona

## **Se estudió la utilización de diferentes fuentes de carbono más propias de otras poblaciones presentes en los digestores (acetógenas y metanógenas acetoclásticas) y se comparó este crecimiento con el contenido utilizando glucosa y sin añadir ninguna fuente de carbono**

(15 g); extracto de hígado (2,5 g); extracto de levadura (5 g); cloruro sódico (5 g); agar de calidad bacteriológica (12 g). El medio se suplementa con un 5% de sangre carnero hemolizada. El pH final del medio es  $7,4 \pm 0,1$  a  $25^\circ\text{C}$ .

## **Determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios de una y dos etapas.-**

Se aplicó el protocolo propuesto en este trabajo a la determinación de la biomasa viable en digestores anaerobios termofílicos de vinazas de vino. Los resultados son contrastados con la cuantificación de población total (viables y no viables) determinada por microscopía de epifluorescencia con DAPI (Kepner, 1994; Solera 2001).

## **Resultados y discusión**

### **Puesta a punto de la cabina de anaerobios.-**

Para el proceso de arranque y puesta en funcionamiento de la cabina de anaerobios, inicialmente, se realizaron un total de veinte ciclos de purga con nitrógeno y seis con gas anaerobio (según las especificaciones del manual Forma Scientific, Inc). Transcurrido un tiempo muy superior al especificado en el manual de instrucciones (1 hora), desde la finalización de la operación de arranque, se observó que en el interior del sistema permanecía oxígeno. Se procedió a repetir la operación varias veces, incrementando, progresivamente, los ciclos de purga con ambos gases, hasta lograr una

atmósfera anaerobia en el interior del equipo. El éxito de la operación tuvo lugar con treinta ciclos de purga con nitrógeno y quince con gas anaerobio, y después de transcurridas doce horas de la finalización del mismo.

Una vez conseguidas las condiciones anaerobias en la cámara, se procedió a introducir material en el interior de la misma para lo cual se realizó la operación de transferencia, de modo automático, según se especifica en el manual del equipo (dos purgas con nitrógeno y una con gas anaerobio), observándose, una vez introducido el material en el interior, que la atmósfera de la cámara se contaminaba con oxígeno. Después de unas doce horas, se comprobó que el sistema, por sí mismo, no presentaba suficiente capacidad de eliminación de este gas. Por ello, se decidió **optimizar la operación de transferencia**, y asegurar las condiciones necesarias para lograr una atmósfera anaerobia en esta zona del equipo, antes de realizar cualquier intercambio con el interior de la cámara. Para ello se introdujo una tira indicadora BBL en esta zona y se aumentó, paulatinamente, el número de ciclos de purga hasta cuatro purgas con nitrógeno y dos con gas anaerobio. Transcurridos 30 minutos desde la última purga con gas anaerobio la pérdida de color de la tira indicadora mostraba que se habían alcanzado las condiciones anaerobias en esta zona. Se procedió, a continuación, a introducir material en la cámara sin perturbar esta vez su atmósfera anaerobia.

Además de lo anterior, existen otra serie de factores que influyen también en el **mantenimiento de la atmósfera anaerobia** interna: frecuencia de regeneración de catalizador y desecante, contenido de humedad de la cámara y renovación del gas anaerobio en el interior. La regeneración del catalizador de paladio y del desecante, que en un principio se realizaba con una frecuencia de una vez por semana, se aumentó hasta una vez al día en los periodos en que la preparación de medios de cultivo y de incubación se realizaban intensamente. Hay que considerar que cuando el medio de cultivo se realizaba en condiciones

	Nº colonias /placa (dilución 10 <sup>4</sup> )	UFC/mL (106)
Condiciones anaerobias	209 158	1,84 ± 0,36
Condiciones aerobias/ anaerobias	211 372 236	2,73 ± 0,87

**Tabla 1.- Resultados del crecimiento obtenido en medios preparados en condiciones anaerobias y aerobias/anaerobias.**

## 1. Elaboración del medio de cultivo, agua de dilución y solución de agente reductor

### Medio de cultivo

Composición básica descrita en Material y Métodos. Agar al 2% e hidrocloreuro de cisteína (0,5g/L). Adición de ingredientes en condiciones aerobias.

### Agua de dilución

Composición básica idem medio de cultivo, excepto agar

### Solución de agente reductor (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O)(0,6g/L)

Elaboración en condiciones anaerobias

## 2. Esterilización de los componentes anteriores

120°C, 20 minutos

## 3. Transferencia al interior de la cámara anaerobia

Operación de transferencia : 4 purgas con N<sub>2</sub> y 2 con gas anaerobio

## 4. Distribución y solidificación del medio en las placas

Adición de la solución de agente reductor al medio de cultivo.  
Renovación de la atmósfera interna de la cámara : 10 ciclos de vacío y purga con gas anaerobio en la zona de transferencia por cada 1,5L de medio preparado.

## 5. Siembra e incubación

Inóculo: 0,1 mL/placa.  
Temperatura de incubación: 55°C.  
Periodo de incubación: hasta estabilización del crecimiento (72 horas)

## 6. Recuento y caracterización del crecimiento

Conteo de las unidades formadoras de colonias. Caracterización del crecimiento mediante detección de autofluorescencia al microscopio.

*Diagrama secuencial del protocolo de la técnica de recuento en placa*

aerobias contenía oxígeno en su composición, así como en el material utilizado en la preparación y manipulación del mismo, y en la siembra (el material de vidrio suele contener res-

tos de oxígeno adherido a sus paredes). Además del vapor desprendido al distribuir el medio en las placas como consecuencia del enfriamiento y solidificación. El exceso de hume-

dad impedía la eliminación del oxígeno contenido en el medio de cultivo, durante su enfriamiento y solidificación, aunque se mantuvieran abiertas las placas más de 24 horas antes de la siembra. Para solucionar este problema se procedió a aumentar la capacidad de desecación de la cámara introduciendo tres recipientes de 250 mL rellenos con silicagel, los cuales debían ser regenerados (160°C, 2 horas) después de cada distribución y solidificación del medio en las placas. Además, una vez que el medio era distribuido en las placas, se procedía a renovar la atmósfera del interior de la cámara. De esta forma se consiguió corregir los problemas causados por el exceso de humedad y así conseguir un medio carente de oxígeno

**Medios de cultivos.-** Las placas se inocularon con efluente del digester monoetapa, que operaba con un THR de 10 días, una velocidad de carga orgánica de 1,35 gDQO/L/d y una concentración de sólidos volátiles en suspensión (SVS) de 315 mg/L, presentando una eficacia depurativa del 70%. El crecimiento se estabilizó a las 72 horas. Los resultados de este ensayo se recogen en la Tabla 1. En esta tabla, se indican las unidades formadoras de colonias en cada placa y los resultados medios, correspondientes a la mayor dilución utilizada.

La semejanza en los resultados obtenidos indica que la preparación del medio en las dos condiciones ensayadas no produce un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano. Acorde con los resultados obtenidos por Downs (1990).

**Protocolo de realización propuesto.-** en el diagrama adjunto se resume el protocolo de realización propuesto en este trabajo para la determinación de biomasa viable en digestores anaerobios.

**Optimización de las condiciones de crecimiento de las bacterias acidogénicas: influencia del pH.-** Los resultados correspondiente al estudio de la influencia del pH en el creci-

miento de las bacterias acidogénicas se exponen en la Tabla 2.

A raíz de los resultados obtenidos se puede deducir que el pH óptimo para el crecimiento en placa de microorganismos anaerobios termofílicos se sitúa en torno a la neutralidad; una ligera alcalinización del medio de cultivo (pH 8) parece no afectar tanto al crecimiento de estas bacterias como la acidificación del mismo a un pH menor de 6.

### Estudio de la utilización de diferentes fuentes de carbono.-

Los resultados correspondientes a este ensayo se muestran en la Tabla 3. Se utilizó la glucosa para establecer una comparación entre este sustrato fácilmente degradable y propio de las bacterias acidogénicas y así poder establecer una comparación entre esta población y las de acetogénicas y metanógenas acetoclásticas.

La obtención de crecimiento en todos los casos y la ausencia de autofluorescencia en las colonias, indicó que los ingredientes básicos, presentes en todos los medios de cultivo utilizados en este ensayo, cubren los requerimientos nutricionales de las bacterias acidogénicas, presumiblemente, ya que tiene un crecimiento mucho más rápido que las acetogénicas.

La complejidad del medio de cultivo necesaria para el crecimiento de las bacterias metanógenas (son los microorganismos que mayor dificultad presentan para crecer en medio sólido) conlleva que las bacterias acidogénicas, mucho menos exigentes en las condiciones nutricionales, puedan crecer aunque no se adicione al medio

pH	Dilución (10 <sup>6</sup> ) colonias/placa	UFC/mL (x 10 <sup>6</sup> )
5,81	21 11	1,6 ± 0,7
7,13	325 298 250	28,8 ± 5,0
8,11	158 283	15,8 ± 9,0

Tabla 2.- Efecto del pH del medio de cultivo en el crecimiento de bacterias acidogénicas

glucosa	3,30 ± 0,60
acetato	3,07 ± 1,00
butirato	2,90 ± 0,80
propionato	1,55 ± 0,40
Sin fuente de carbono	3,50 ± 0,70

Tabla 3.- Estudio de la influencia de diferentes fuentes de carbono en el crecimiento de la biomasa acidogénica

una fuente de carbono específica.

Los resultados correspondientes al ensayo de crecimiento de metanógenas se muestran en la Tabla 4.

Los resultados de crecimiento en esta prueba se corresponden, probablemente, con crecimiento metanogénico, excepto el correspondiente al medio constituido básicamente por efluente acidogénico, en el que no se observó fluorescencia alguna.

Hay que destacar que en las placas incubadas con efluente metanogénico y en las que contienen borohi

	UFC/mL (x 10 <sup>4</sup> )	
	Efluente R10	Efluente Metanogénico
acetato	no hubo crecimiento	1,64 ± 0,04
borohidruro de sodio	3030±500 (*)	
efluente acidogénico	272 ± 60	

Tabla 4.- Ensayos de crecimiento en placa con diferentes medios específicos para metanógenas

(\*) resultado total UFC/mL.

druro de sodio, se detectó más fluorescencia que en los restantes casos. Resulta significativa la ausencia de crecimiento en el medio que contiene acetato como fuente de carbono inoculado con efluente del digester monoetapa (THR 10 días). Este mismo medio inoculado con efluente del reactor metanogénico (enriquecido con microbiota metanogénica) da lugar a resultados positivos lo que parece confirmar que, efectivamente, se trata de crecimiento metanogénico. Probablemente, diluciones menores para el efluente del reactor monoetapa permitirían detectar crecimiento.

No obstante, la principal dificultad para constatar que se trataba de crecimiento exclusivamente metanogénico radica en que la fluorescencia observada no era total para las diferentes colonias. Una posibilidad para explicar este fenómeno es que se trata de un crecimiento mixto (asociado con otras poblaciones presentes en el cultivo: acidogénica y/o acetogénica).

### Ensayo complementario: prueba de sensibilidad a antibióticos.-

Los resultados de este ensayo son cualitativos, así en la Tabla 5 se indica la sensibilidad o resistencia a cada uno de los antibióticos utilizados en esta prueba.

En principio las bacterias acidogénicas podrían ser sensibles a los antibióticos β-lactámicos, por tratarse de

Tipo de antibiótico	Respuesta
<b>β-lactámicos</b>	
Ampicilina	R
Sulfabactimicina	R
Cefazolina	R
Cefotaxime	S
Cefoxitina	R
Cefuroxima	R
Ceftazidima	S

R, resistencia; S, sensible

Tabla 5.- Resultados de la sensibilidad a antibióticos de la biomasa acidogénica



Reactor	THR	VCO <sub>0</sub>	DQO <sub>c</sub>	pH <sub>e</sub>	Biogas	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>
Monoetapa	10	1.44	82.1	7.35	0.47	82	18	0
Monoetapa	4	3.75	80.1	7.60	0.80	85	15	0
Acidogénico	4	3.79	30.1	5.53	0.18	66	29	7
Metanogénico	4	2.65	71.7	7.80	0.45	91	9	0

**Tabla 6.** - Resultados de los principales parámetros de operación y control del proceso de digestión anaerobia en los sistemas monoetapa y de fases separadas.

THR (días); velocidad de carga orgánica (VCO<sub>0</sub>) expresada en g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; eficacia de depuración (porcentaje de DQO inicial eliminada); pH; volumen de biogas generado expresado como L·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> digestor; porcentajes de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, y H<sub>2</sub> en el biogas.

eubacterias, pero esta sensibilidad no es universal sino que depende del género bacteriano: los resultados obtenidos son una prueba de ello.

Los resultados muestran que la población acidogénica, seleccionada en los digestores anaerobios de la línea de investigación a la que pertenece el presente trabajo, es sensible a los antibióticos Cefotaxime y Ceftazidima. Por ello, en ensayos futuros relacionados con el enriquecimiento y crecimiento de las bacterias metanógenas podrían utilizarse estos antibióticos para inhibir el crecimiento de la población acidogénica.

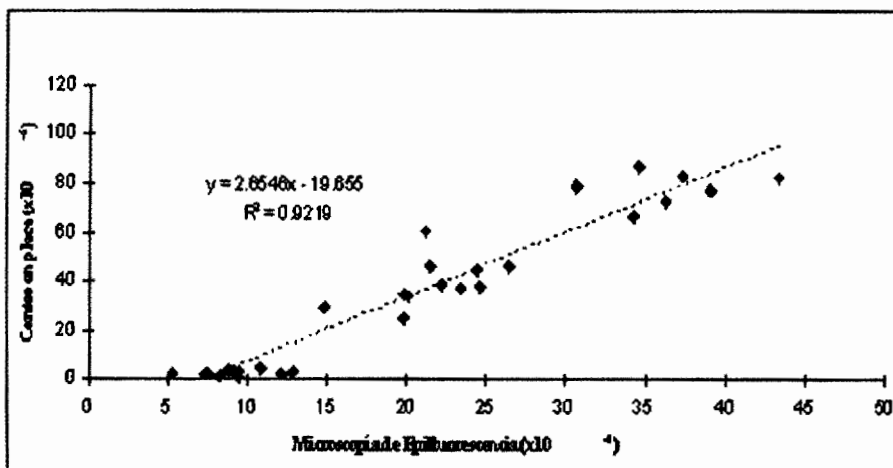
### Determinación de la biomasa viable contenida en digestores anaerobios de una y dos etapas.

Las características principales de operación y funcionamiento de los digestores anaerobios de vinazas de vino a los que se ha determinado su biomasa viable se muestran en la Tabla 6. Los resultados de crecimen-

to se exponen en la Tabla 7.

En este ensayo se ha utilizado el protocolo propuesto en este trabajo para la determinación de la biomasa viable empleando como fuente de carbono glucosa, por lo que los resultados de crecimiento corresponden fundamentalmente a la población acidogénica que, por otra parte, constituye el grupo mayoritario de microorganismos presente en los digestores anaerobios. Estos resultados se han correlacionado con los obtenidos en el recuento de población total (viable y no viable) mediante microscopía de epifluorescencia con DAPI. El resultado de esta correlación se muestra en la Figura 6.

La alta correlación que existe entre los resultados obtenidos por microscopía de epifluorescencia y el recuento en placa indica que el protocolo de realización seleccionado en este trabajo es adecuado para el



**Figura 6.** Correlación entre concentración total de microorganismos, por microscopía de epifluorescencia, y concentración de viables, por recuento en placa, en todos los reactores utilizados en los ensayos

Reactor	THR (días)	Población viable (x10 <sup>7</sup> ) <sup>(1)</sup>
Monoetapa	10	0,19±0,06
Monoetapa	4	6,69±0,91
Acidogénico	4	3,95±0,77
Metanogénico	4	0,30±0,11

(1) UFC·mL<sup>-1</sup>; (2) (UFC·mL<sup>-1</sup>·DAPI)100

**Tabla 7.** - Resultados de concentración de microorganismos viables

crecimiento de estas bacterias. Así, este procedimiento de recuento sería representativo de los grupos mayoritarios contenidos en los digestores y, consecuentemente, de la población total presente en los mismos.

## Bibliografía

1. APHA; AWWA; WPCF. (1990). Métodos Normalizados. Para análisis de aguas potables y residuales. Ed: Díaz de Santos, S.A.
2. Archer, D.B. (1984). Hydrogen-using bacteria in a methanogenic acetate enrichment culture. *Journal Applied Bacteriology*, 56, 125-129.
3. Atlas, R. M.; Bartha, R. (1993). Measurement of microbial numbers, biomass and activities. En *Microbial ecology. Fundamentals and applications*. Ed: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 3ª Ed.
4. Doddema, H.J.; Vogels, G.D. (1978). Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(5), 752-4.
5. Downs, J.; Mangels, J.; Holden, J.; Ferraro, M.; Baron, E. (1990). Evaluation of two single-plate incubation system and the anaerobic chamber for the cultivation of anaerobic bacteria. *J.Clin.Microbiol.*, feb, 246-8.
6. Edwards, T.; McBride, B. (1975). New methods for isolation and identification of methanogenic bacteria. *Appl. Microbiol. Apr.*, 540-545.
7. Kepner, R.L.; Pratt, J.R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.*, 58 (4), 603-615.
8. Maestrojuan, G. (1987). Microbiología y bioquímica del proceso de depuración anaerobia: estudio de las interacciones entre las bacterias anaerobias y los materiales utilizados para su inmovilización. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.
9. Nebot, E.; Romero, L.I.; Quiroga, J.M.; Sales, D. Effect of the Feed Frequency on the Performance of Anaerobic Filters. *Anaerobe*, 1, 113-120. (1995).
10. Sales, D.; Valcárcel, M.J.; Pérez, L.; Martínez de la Ossa, E. (1982). Determinación de la carga contaminante y naturaleza de los vertidos de destilerías de alcohol de vino y alcohol vínic. *Química e Industria*, 28 (10), 701-706.
11. Solera, R.; Romero, L.I.; Sales, D. (2001). Determination of the microbial population in thermophilic anaerobic reactor: comparative analysis by different counting methods. *Anaerobe* (en prensa).