

### 3. OBTENCIÓ DE CULTIUS D'ENRIQUIMENT DE BACTERIS METANÒGENS

#### 3.1. Introducció

Els bacteris metanògens són extremadament sensibles a l'oxigen i per a aïllar-los es necessiten condicions anaeròbies estrictes i un potencial redox negatiu (de l'ordre de  $-250$  mV segons Zehnder, 1988 i de  $-380$  mV segons Jorgensen a Bhattacharya *et al*, 1996). Per a aïllar-los s'utilitzen dues estratègies generals (Whitman *et al*, 1992), una d'elles és l'ús d'antibiòtics com a inhibidors selectius dels eubacteris: com que els metanògens són arqueobacteris, molts dels seus sistemes enzimàtics no es veuen afectats per una àmplia varietat d'antibiòtics comuns; l'altra manera d'aïllar els bacteris metanògens és l'obtenció de cultius d'enriquiment, en fer-los s'ha de tenir present que en condicions similars poden créixer bacteris fotosintètics, bacteris desnitrificants o bé bacteris que competeixen pel substrat amb els metanògens.

Els metanògens generalment competeixen pels substrats amb tres altres grups d'anaeròbis en hàbitats naturals (Zinder, 1993): els bacteris sulfatoreductors, els acetogènics consumidors d' $H_2$  i els reductors de ferro (III). Els sulfatoreductors, que poden utilitzar sulfat, tiosulfat, sulfit o sofre elemental com a acceptors electrònics produïnt sulfur com a producte reduït majoritari, poden utilitzar molts més donadors d'electrons que els bacteris metanògens incloent àcids orgànics, alcohols, aminoàcids i compostos aromàtics. S'han fet treballs (Dyreborg *et al*, 1997) en què s'han fet créixer bacteris metanògens i sulfatoreductors al mateix rang de  $E^{\circ}$  redox, de  $-210$  a  $-150$  mV. Els acetògens consumidors d' $H_2$  anomenats també homoacetògens, poden utilitzar una varietat de substrats encara major, incloent sucres, purines, i grups metoxi de compostos aromàtics metoxilats. Els bacteris reductors del ferro poden utilitzar  $H_2$ , acetat, formiat o compostos orgànics com a donadors d'electrons. En hàbitats en què el substrat orgànic o donador d'electrons és limitant, hi ha una jerarquia de

competició per al donador d'electrons en la qual els diferents grups de microorganismes poden deixar fora de competició altres grups depenent de les condicions del medi. Comparant dades d'espontaneïtat de les reaccions en condicions metabòliques,  $\Delta G^{\circ}$  (Thauer 1977 *in* Ferry, 1993), es veu que la reacció que té una variació d'entalpia lliure més negativa és la dels bacteris reductors del ferro (III), seguida de la sulfatoreducció, la metanogènesi i l'acetogènesi. Aquest mateix és l'ordre amb què els diferents grups de bacteris competidors s'exclouen entre sí. Les interaccions entre aquests grups de bacteris en digestors anaerobis han estat força estudiades (Ueki *et al*, 1992; Stams, 1994; Harada *et al*, 1994; Bhattacharya *et al*, 1996; Eismann *et al*, 1996; Nakamoto *et al*, 1996; Krylova *et al*, 1997).

Així doncs per a fer cultius d'enriquiment de bacteris metanògens, poden excloure's els bacteris fototròfics fent la incubació a les fosques; l'omissió de nitrat, sulfat o altres compostos oxidats de sofre, i de ferro (III) en el medi de cultiu descarta l'enriquiment en bacteris desnitrificants, sulfatoreductors o reductors del ferro respectivament.

Balch i Wolfe (1976) descriuen un **medi per al creixement de metanògens** consistent en una solució de sals, extracte de llevat, resazurina com a indicador redox i sulfur de sodi, cisteïna i HS-CoM, que proporcionen les condicions reductores adequades. Segons la bibliografia consultada força autors (Jones *et al*, 1983; Koga *et al*, 1987; Nishihara *et al*, 1987; Holzer *et al*, 1988; Kakinuma *et al*, 1990; Sprott *et al*, 1990; Morii i Koga, 1993; Harada *et al*, 1994; Shouten *et al*, 1997; Koene-Cottaar i Schraa, 1998) utilitzen medis de cultiu similars al descrit o amb lleugeres modificacions. També es descriuen experiències (Oremland *et al*, 1989; Vila, 1993; Edwards i Grbic-Galic, 1994; Kazumi *et al*, 1997; Lomans *et al*, 1999) amb un medi molt similar a l'anterior però que consta d'una solució de vitamines en comptes d'extracte de llevat. Whitman (1992) fa un recull bibliogràfic de diversos autors i proposa un medi de cultiu per inòculs procedents d'aigua dolça, fang residual i espècies del tracte intestinal d'herbívors, que consisteix en una solució de sals, una de minerals traça, una de vitamines, extracte de

llevat, resazurina com a indicador redox i sulfur-cisteïna que proporciona el potencial redox adequat; el pH recomanat és el neutre, 7.0.

Altres autors (Baresi *et al*, 1978; Finster *et al*, 1992; Madsen *et al*, 1995; Bhattacharya *et al*, 1996; Chaudhuri i Wiesmann, 1996; Eismann *et al*, 1996; Li *et al*, 1996) utilitzen un medi d'enriquiment similar als anteriors en contingut i proporcions de sals però que conté una solució de minerals traça i no conté extracte de llevat ni vitamines. Hi ha experiències (Jones *et al*, 1991) que utilitzen un medi fluid de rumen complex per a l'enriquiment en bacteris metanògens. Si bé en la majoria dels casos s'ha trobat que el medi reductor necessari s'obté a partir de compostos amb sulfur, hi ha autors (Madsen *et al*, 1995) que hi utilitzen citrat de titani (III).

Pel que fa a la **tècnica per a l'obtenció de cultius d'enriquiment** la major part descriu els cultius fets en vials tancats hermèticament. En ells el medi líquid ocupa la part inferior, mentre que la part superior del vial és ocupada majoritàriament o bé amb una atmosfera inert ( $N_2$  en la major part dels casos) o bé amb  $H_2$  i  $CO_2$  que permetran la reducció del diòxid de carboni per part dels bacteris metanogènics. L'obtenció de cultius d'enriquiment també s'ha descrit en cultius tancats amb medi d'agar (Jones *et al*, 1983; Hermann *et al*, 1986), fent un primer enriquiment en medi líquid i els enriquiments successius en agar (De Rosa *et al*, 1983), en reactors continus (Gupta *et al*, 1994 a i b; Harada *et al*, 1994; Aguilar *et al*, 1995; Bhattacharya *et al*, 1996; Li *et al*, 1996), en experiments semi-batch (Eismann *et al*, 1996) i en gradients de partícules col·loïdals recobertes amb una capa de polivinilpirrolidona (Putzer *et al*, 1991).

La **mesura del creixement bacterià** i enriquiment en bacteris metanògens està descrita per diferents tècniques:

- Mesurant la **composició de gasos** a la part superior del vial tancat o la composició del biogàs obtingut per cromatografia de gasos (Balch i Wolfe, 1976; Mawson *et al*, 1992; Vila, 1993; Harada *et al*, 1994; Chaudhuri *et al*, 1996; Li *et al*, 1996; Veltman *et al*, 1998; Lomans *et al*, 1999) si la pressió del gas acumulat en la part superior del vial és massa elevada, s'extreu part de la mescla de gasos amb una xeringa (Veltman *et al*, 1998, Zengler *et al*, 1999).

- **Observació microscòpica** (Baresi *et al*, 1978; Jones *et al*, 1983; Oremland, 1989; Kataoka *et al*, 1991; Vila, 1993; Gupta *et al*, 1994 a; Koene-Cottaar i Schraa, 1998).

- **Extracció i purificació de material genètic** (Burgraff *et al*, 1991).

- Mesura de la **terbolesa** del cultiu ( De Rosa *et al*, 1983b, Ferrante *et al*, 1987; Putzer *et al*, 1991; Finster *et al*, 1992).

- **Anàlisi lipídica** (Tornabene i Langworthy, 1978; Sprott i McKellar, 1980; Sprott *et al*, 1990, 1994a i b; Kushwaha *et al*, 1982 a i b; Comita i Gagosian, 1983; Comita *et al*, 1986; Nishihara *et al*, 1987; Koga *et al*, 1987; Nichols *et al*, 1987, 1993; Holzer *et al*, 1988; Trincone *et al*, 1988; Morii i Koga, 1994, Schouten *et al*, 1997). Hi ha experiències que mostren que hi ha una bona correlació entre la concentració de difitanilglicerolèter, lípid comú als bacteris metanògens, i el metà total produït al llarg del temps (Smith i Floodgate, 1992) i que l'anàlisi lipídica pot ser utilitzada per a estimar la biomassa total i l'estructura de la població (Demizu *et al*, 1992).

En el **present treball** es fan cultius d'enriquiment de bacteris metanògens a partir de fang de digestió anaeròbia de la depuradora d'aigües residuals de Manresa i de tapets

microbians de les salines de La Trinitat (Delta de l'Ebre). Els cultius s'han efectuat en vials tancats en medi líquid. La mesura del creixement bacterià s'ha fet analitzant el contingut dels gasos de la part superior dels vials per cromatografia de gasos. S'han utilitzat **acetat** i **dimetilsulfur** com a fonts de carboni. En tots els casos s'ha fet l'anàlisi lipídica del cultiu posterior a la fase de creixement exponencial analitzant les extraccions amb cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (capítol 5).

### **3.2. Preparació i neteja del material**

Per a dur a terme tots els cultius d'enriquiment ha estat necessari adequar el Laboratori de Microbiologia de l'Escola Universitària Politècnica de Manresa per a treballar amb bacteris anaerobis, amb els que no s'hi havia treballat abans d'aquesta tesi.

L'aigua utilitzada per a la preparació dels medis de cultiu així com per esbandir el material de les experiències descrites als apartats 3.3, 3.4 i 3.5, ha estat aigua primer desionitzada i posteriorment destil.lada sobre permanganat, que s'ha guardat en ampolles de vidre amb tap roscat protegit amb paper d'alumini. A les experiències descrites als capítols 4 i 5 s'ha utilitzat aigua de qualitat mili-Q.

El material de vidre utilitzat per a preparar els medis de cultiu, així com els vials s'han rentat amb aigua i sabó i posteriorment han estat un mínim de 16 hores submergits en HCl 1 M. Posteriorment el material s'ha esbandit amb aigua corrent i finalment amb aigua destil.lada. El material s'ha assecat amb una estufa d'aire forçat a 110°C. Si no ha necessitat esterilització prèvia, s'ha guardat protegit amb paper d'alumini. En cas contrari s'ha esterilitzat amb un autoclau (Trade Raypa, Sterilclav 75) durant 20 minuts a 120°C i 1 atmosfera i s'ha guardat protegit amb el mateix envoltori amb què s'ha esterilitzat fins al moment de la seva utilització.

També s'han utilitzat xeringues farmacèutiques de plàstic i agulles hipodèrmiques estèrils. Les sals emprades en l'elaboració del medi han estat com a mínim de qualitat puríssima (PRS Panreac, Fluka).

L'entorn estèril s'ha aconseguit treballant a prop de la flama d'un fogó d'alcohol. Les addicions estèrils de líquids als cultius han estat realitzades a prop de la flama, amb xeringues i agulles estèrils i passant per la flama l'agulla, la boca del recipient contenidor del líquid i el tap abans d'agafar el líquid i abans de tornar a tancar; també s'ha passat per la flama la boca dels vials tancats hermèticament abans d'injectar-hi el líquid.

### 3.3. Obtenció de cultius d'enriquiment de bacteris metanògens a partir de fang de depuradora utilitzant acetat com a font de carboni.

#### 3.3.1. Material i mètodes

##### Preparació del medi

La tria del medi a preparar s'ha fet valorant alhora la senzillesa i els bons resultats descrits a partir de la bibliografia, per això s'ha triat el mètode descrit per Baresi i Mah (1978), amb algunes modificacions.

Es prepara una mescla que conté, per litre d'aigua destil.lada:

0,8 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$

0,1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,312 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

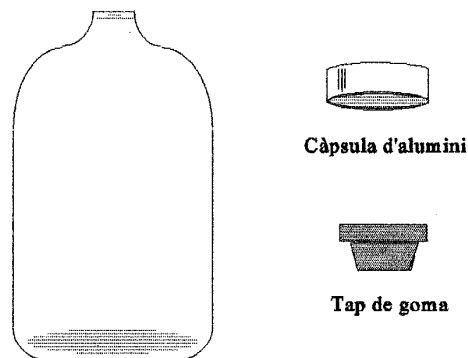
10 g de  $\text{CaCO}_3$

20 g  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$

1 ml de resazurina al 1%

Amb aquests compostos i proporcions queda carbonat de calci no dissolt, que es separa per decantació. La solució pren un color blau degut a l'indicador resazurina. El pH ha d'estar entre 6,5 i 6,6. Si no ho està es rectifica amb  $\text{HCl}$  1M o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M.

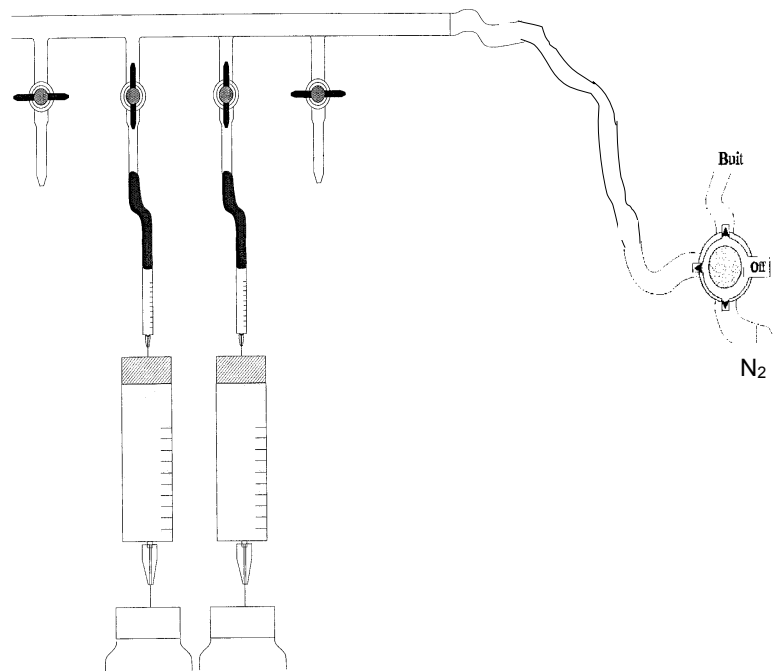
Posteriorment s'omplen els vials, de 100 ml de capacitat, amb 65 ml o 40 ml de solució, es tapen amb un tap de goma de 9 mm de gruix i s'hi col.loca una càpsula d'alumini (**figura 3.1**)



**Figura 3.1.** Esquema del tancament dels vials

Quan es tenen els vials tancats es procedeix a treure aire de l'espai superior i injectar-hi nitrogen per tal de deixar els cultius sota atmosfera de nitrogen. Amb el procediment descrit a continuació disminuirà la quantitat d'oxigen, que acabarà de baixar fins als nivells necessaris amb l'addició posterior de sulfur de sodi. Aquest compost reacciona amb l'oxigen dissolt i per tant fa desplaçar l'equilibri entre l'oxigen lliure i l'oxigen dissolt cap a aquest darrer, fins a deixar el gas pràcticament lliure d'oxigen i proporcionar el medi reductor adient. Cada vial es connecta alternativament al buit i a un corrent de  $N_2$  (0,20-0,25 bar) en tres seqüències de cinc minuts buit-cinc minuts nitrogen: es connecta el vial mitjançant una xeringa amb cotó hidròfob al seu interior que actua com a filtre per a bacteris, prèviament esterilitzat el conjunt, i que a l'altre extrem està connectada a una clau de tres vies que permet la connexió a una trompa de buit o l'injecció de nitrogen a la part superior del vial (**figura 3.2**). S'emboliquen els vials amb paper d'alumini per a evitar el creixement de bacteris fototròfics i es deixen 16 hores sota pressió de nitrogen.





**Figura 3.2.** Representació esquemàtica del procés per extreure l'aire i introduir nitrogen als vials.

A continuació els vials s'esterilitzen ( 20 minuts, 120°C, 1 atm) i es deixen refredar fins a temperatura ambient. El color dels vials segueix blau. Seguidament s'afegeix a cada vial una solució preparada al moment amb aigua esterilitzada de  $\text{Na}_2\text{S}$  1% i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5%. La quantitat addicionada és 1.2 ml ( per als vials de 40 ml de medi) o 1.9 ml ( pels de 65 ml). Les addicions es fan amb material i entorn estèril. El pH s'ajusta a 7.0-7.1 amb l'addició estèril de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M o bé HCl 1M preparats amb aigua esterilitzada. Després d'aquest procés el color del medi ha de ser transparent. Si hi entra oxigen la resazurina pren color rosa. Per a verificar que els vials estan tancats hermèticament es deixen 24 hores abans d'inocular-los.

### **Inòcul**

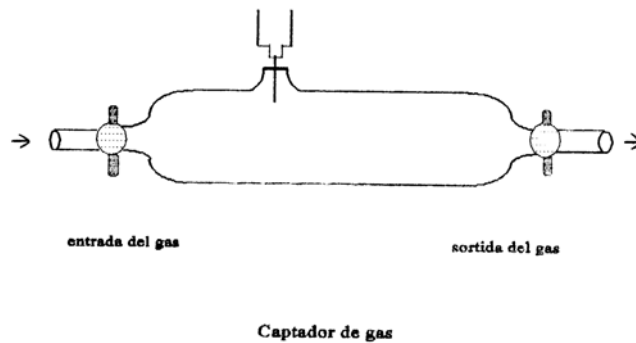
Cada vial s'inocula amb un volum de fang corresponent al 7% del volum de líquid total, amb xeringa i ambient estèril. En alguns casos s'ha hagut de canviar l'agulla una o més vegades durant el procés, ja que quedava obturada amb el fang.

El fang utilitzat procedeix d'un dels dos digestors anaerobis iguals que hi ha a la Depuradora d'aigües residuals de Manresa (Bages) depenent de la companyia Aigües de Manresa, S.A. El fang es recull a la sortida del mig del reactor, deixant que ragi el del principi, amb un pot de vidre. L'inòcul es fa tot seguit de manera que el temps que passa entre que el fang surt del reactor i l'últim medi inoculat sigui petit (de minuts a poques hores).

Una vegada inoculats, els vials són incubats a les fosques dins d'una estufa a 37°C.

### **Mesura del creixement bacterià**

La mesura de l'enriquiment en bacteris metanògens s'ha fet analitzant periòdicament la composició gasosa de l'espai que queda la part superior dels vials per cromatografia de gasos (Varian 9176 recorder). La columna emprada és porapak N malla 80/100 10 m x 1/8 polsades, i s'ha operat amb els controladors de temperatura tancats, és a dir a temperatura ambient (aproximadament 20°C), 135 mA, el gas portador: He (pressió entrada 4 bar). Els temps de retenció del nitrogen, que inicialment és l'únic gas que ocupa l'espai, i del metà s'han mesurat injectant inicialment una mostra d'aire i una de gas ciutat, agafada directament de la xarxa amb un captador de gasos (**figura 3.3**).

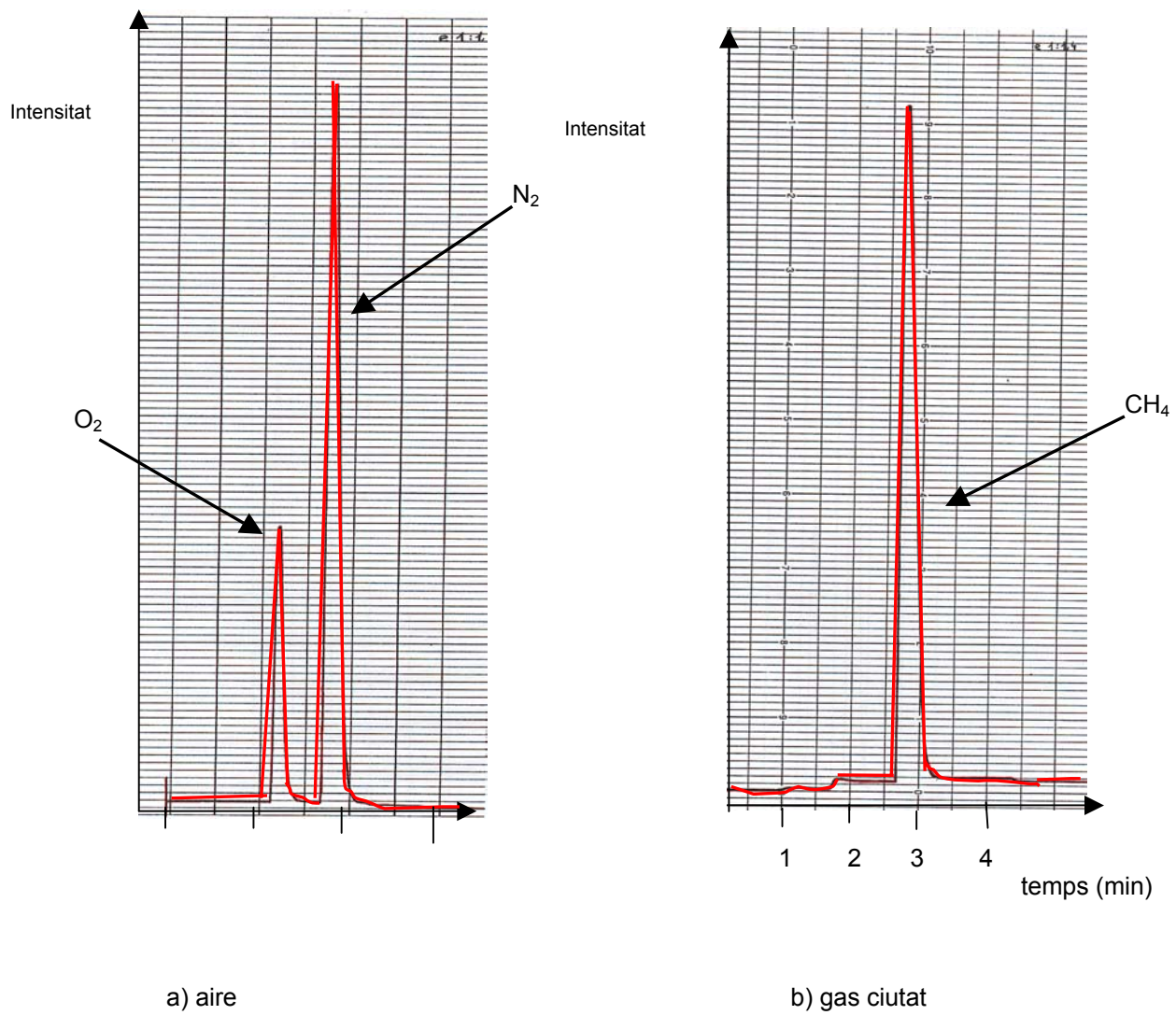


**Figura 3.3.** Captador de gas

### 3.3.2. Resultats

A la **figura 3.4a** es veu el perfil cromatogràfic de l'aire, amb els dos pics característics: el de l'oxigen, menor, que té un temps de retenció de poc més d'un minut, i el pic del **nitrogen**, component majoritari de l'aire, amb un **temps de retenció** aproximat d'**un minut i mig**. Aquest perfil s'ha utilitzat com a patró pel nitrogen.

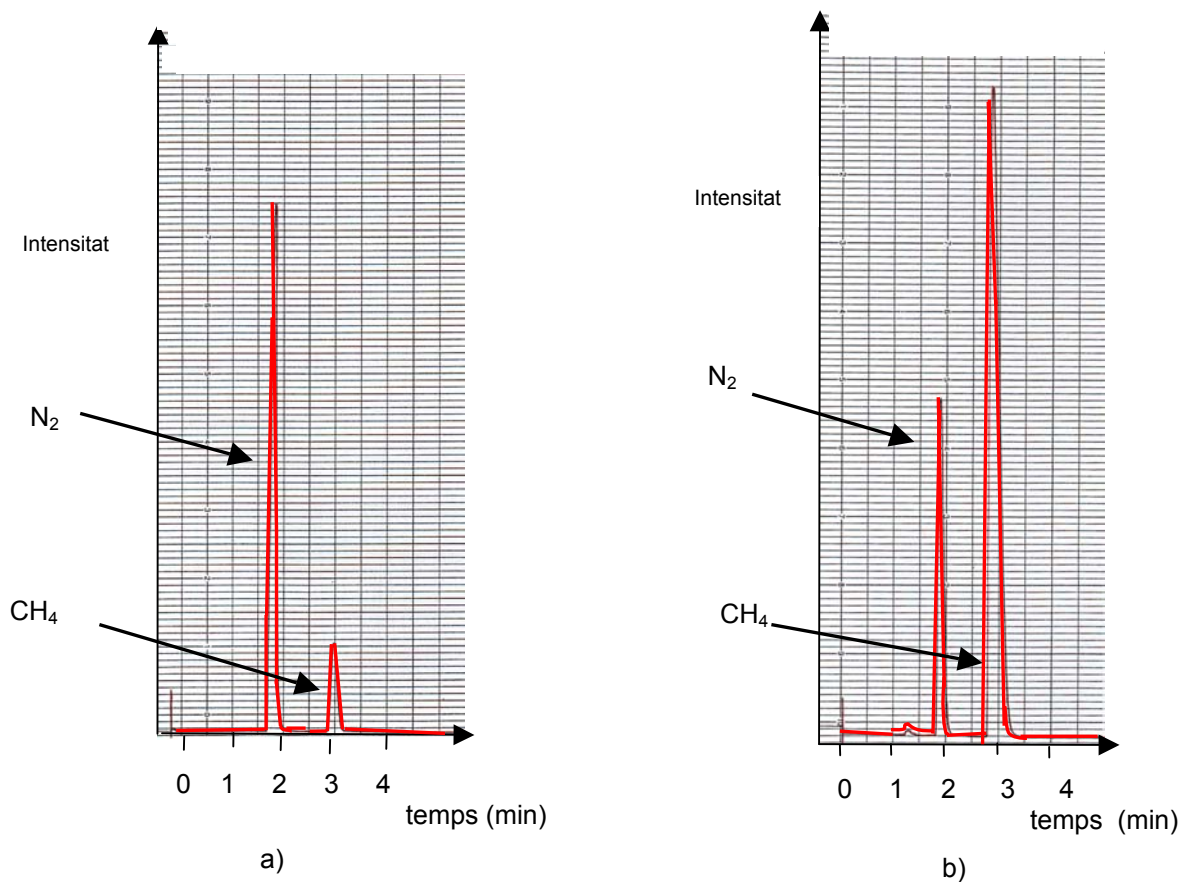
A la figura **3.4 b** es veu el perfil del gas ciutat, utilitzat com a patró pel **metà**, en ell pot veure's que el temps de retenció per aquest gas és de poc més de **dos minuts i mig**.



**Figura 3.4.** Cromatogrames patró

L'anàlisi cromatogràfica de la composició gasosa de la part superior dels vials dóna dos pics, identificables com a nitrogen i metà a partir dels temps de retenció. A partir de les àrees es calculen els percentatges de N<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub>, considerant només aquests dos gasos.

A la **figura 3.5** es mostren, a tall explicatiu, dos d'aquests cromatogrames d'un dels vials a diferents temps des de la data d'inòcul. En ells pot veure's que el percentatge de metà ha augmentat i el de nitrogen ha disminuït amb el temps. Com que la quantitat absoluta de nitrogen és constant, ja que és la de l'atmosfera anaeròbia inicial de la part superior del vial, pot concloure's que hi ha hagut producció neta de metà, deguda a bacteris metanogènics. Hi ha estudis que mostren que hi ha correlació entre la proporció de metà i la massa cel.lular (veure apartat 3.1), i en ells es basa el present estudi per a mesurar el creixement bacterià.



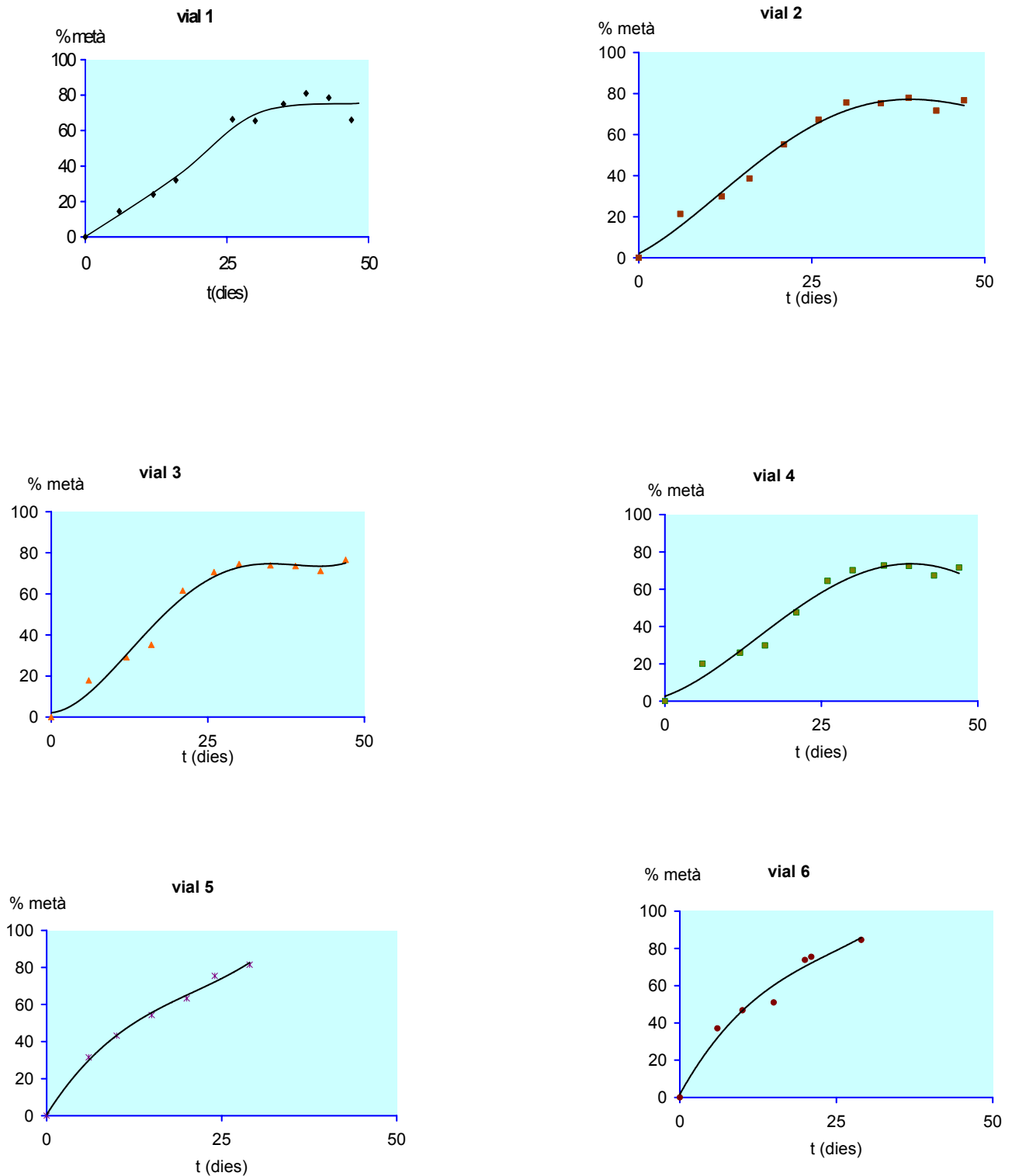
**Figura 3.5.** Cromatogrames de gasos del vial 3

- a) al cap de 6 dies de l'inòcul ( % N<sub>2</sub> = 85,6; % CH<sub>4</sub> = 14,4)
- b) al cap de 39 dies de l'inòcul ( % N<sub>2</sub> = 18,9; % CH<sub>4</sub> = 81,1)

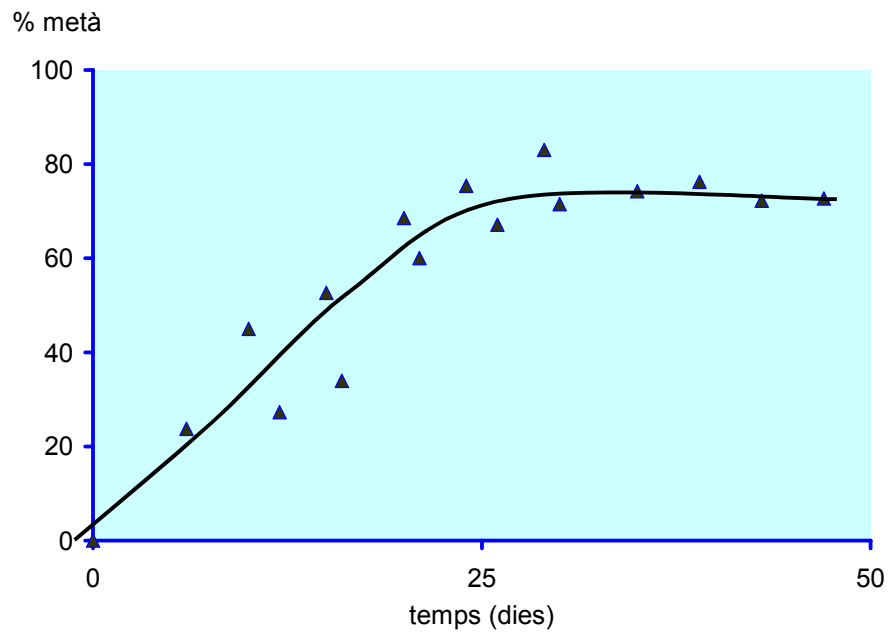
**Taula 3.1.** Percentatge de metà al llarg del temps per a cada vial.

TEMPS(DIES)	VIAL 1	VIAL 2	VIAL 3	VIAL 4	VIAL 5	VIAL 6	MITJANA
0	0	0	0	0	0	0	0
6	14,4	21,4	17,9	20,1	31,5	37,1	23,7
10					43,2	46,8	45,0
12	24	30	29,2	26			27,3
15					54,3	51	52,7
16	32	38,6	35,2	29,9			33,9
20					63,3	73,8	68,6
21		55,3	61,6	47,6		75,5	60,0
24					75,4		75,4
26	66,3	67,2	70,6	64,5			67,2
29					81,5	84,6	82,9
30	65,5	75,6	74,6	70,2			71,5
35	75	75,3	73,9	72,7			74,2
39	81	77,9	73,6	72,5			76,3
43	78,5	71,7	71,2	67,4			72,2
47	66	76,7	76,6	71,6			72,7

A la **figura 3.6** es representa el percentatge de metà al cap del vial per a cada cultiu d'enriquiment amb les dades de la taula 3.1.



**Figura 3.5.** Creixement dels cultius d'enriquiment inoculats a partir de fang de depuradora amb acetat.



**Figura 3.6.** Creixement promig dels cultius d'enriquiment inoculats amb fang de depuradora i substrat acetat.



3.4. Obtenció de cultius d'enriquiment de bacteris metanògens a partir de fang de depuradora utilitzant dimetilsulfur com a font de carboni.

### 3.4.1. Material i mètodes

#### Preparació del medi

El medi d'enriquiment utilitzat en aquest apartat és el descrit per Vila (1993) en l'obtenció de cultius d'enriquiment amb dimetilsulfur, es detalla a continuació i pot veure's esquematitzat a la figura 3.7:

Es prepara una **solució inicial** que conté, per **litre d'aigua destil.lada**:

50 g de NaCl  
 9 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$   
 20 ml de solució Stock A <sup>(1)</sup>  
 10 ml de solució Stock C <sup>(2)</sup>  
 1 ml de solució de minerals traça<sup>(3)</sup>: SL 12-EDTA  
 20 ml HCl 1M  
 1 ml de resazurina al 1%

El color del medi és rosa en aquest moment, que és el color que pren la resazurina en medi àcid i en presència d'oxigen.

**(1) Composició de la solució Stock A:**  $CaCl_2$  20 g/l  
 KCl 40 g/l

**(2) Composició de la solució Stock C:**  $NH_4Cl$  20 g/l  
 $Na_2HPO_4$  8 g/l

**(3) Composició de la solució de minerals traça: SL 12 – EDTA:**

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,1 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,19 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	50 mg
$ZnCl_2$	42 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	24 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	18 mg
$H_3BO_3$	0,3 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2 mg

aigua desionitzada i destil.lada 700 ml

La solució de minerals traça s'esterilitza a 120°C i 1 atm durant 30 minuts.

A continuació s'omplen **vials de vidre** de 100 ml amb **65 ml de la solució**, es **tapen** amb un tap de goma de 9 mm de gruix i s'encapsulen amb una càpsula d'alumini.

Quan es tenen els vials tancats es procedeix a treure aire de l'espai superior i injectar-hi nitrogen per tal de **deixar els cultius sota atmosfera de nitrogen**. Amb el procediment descrit a continuació disminueix la quantitat d'oxigen, que acaba de baixar fins als nivells necessaris amb l'addició posterior d'una solució reductora que conté cisteïna. Aquest compost reacciona amb l'oxigen dissolt i per tant fa desplaçar l'equilibri entre l'oxigen lliure i l'oxigen dissolt cap a aquest darrer, fins a deixar el gas pràcticament lliure d'oxigen i proporcionar el medi reductor adient. Cada vial es connecta alternativament al buit i a un corrent de N<sub>2</sub> ( 0,20-0,25 bar) en tres seqüències de cinc minuts buit-cinc minuts nitrogen: es connecta el vial mitjançant una xeringa amb cotó hidròfob al seu interior que actua com a filtre per a bacteris, prèviament esterilitzat el conjunt, i que a l'altre extrem està connectada a una clau de tres vies que permet la connexió a una trompa de buit o l'injecció de nitrogen a la part superior del vial. S'emboliquen els vials amb paper d'alumini per a evitar el creixement de bacteris fototròfics i es deixen 16 hores sota pressió de nitrogen.

A **continuació els vials s'esterilitzen** ( 20 minuts, 120°C, 1 atm) i es deixen refredar fins a temperatura ambient. A partir d'aquest moment, totes les addicions que es fan per acabar de preparar el medi s'esterilitzen per filtració (0,2 µm) en el moment d'introduir-les al vial.

**S'afegeix a cada vial**, per tal de completar el medi: 0,1 ml solució de vitamines <sup>(4)</sup>

0,6 ml solució cisteïna – carbonat <sup>(5)</sup>

0,25 ml Na<sub>2</sub>S 0,1 M

0,5 ml Coenzim M<sup>(6)</sup>

**(4) Composició de la solució de vitamines**

Vitamina B1 (Tiamina-HCl)	40 mg
Àcid nicotínic	80 mg
Àcid Pantotènic	40 mg
Àcid fòlic	10 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	40 mg
Vitamina H ( Biotina)	16 mg
Vitamina B12 (cianobalamina)	26 mg
PABA (àcid p-aminobenzoic)	40 mg
Àcid lipoic	40 mg
Vitamina B6 (piridoxina-HCl)	200 mg
Aigua desionitzada i destil.lada	1000 ml

Al moment de posar-ho al cultiu s'esterilitza per filtració.

**(5) Composició de la solució de cisteïna-carbonat:**

Aquesta solució es prepara al moment de la seva utilització. S'elabora una solució de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 8%, es posa de 5-10 minuts sota flux de nitrogen. Es fa bullir i se li afegeix cisteïna fins una concentració del 1,8 %. S'agita i s'esterilitza en un autoclau 20 minuts a 120°C.

**(6) Solució CoM-SH**

S'afegeix 0,75 g de 2-mercaptoetanosulfonat de sodi (CoM-SH) a 50 ml d'aigua desionitzada i destil.lada, que s'ha sotmès uns 5-10 minuts sota un flux de nitrogen. No s'esterilitza a l'autoclau, s'esterilitza per filtració.

Una vegada completat el medi **s'ajusta a pH 7** amb HCl 1M o bé Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M.

**En aquest moment el color del medi complert ha de ser incolor i transparent, degut a la resazurina en un medi reductor a pH neutre.**

Seguidament s'afegeix a cada vial el substrat, **0,3 ml de dimetilsulfur**, com que aquest és un compost extremadament volàtil i amb una mala olor característica i molt penetrant, aquesta operació es va fer a l'aire lliure. El dimetilsulfur va ser transportat del congelador a l'exterior dins d'un bany de neu carbònica i acetona.

#### Inòcul

Cada vial va ser **inoculat amb 10 ml de fang** introduït al vial amb una xeringa, a la flama per tal de mantenir l'entorn estèril.

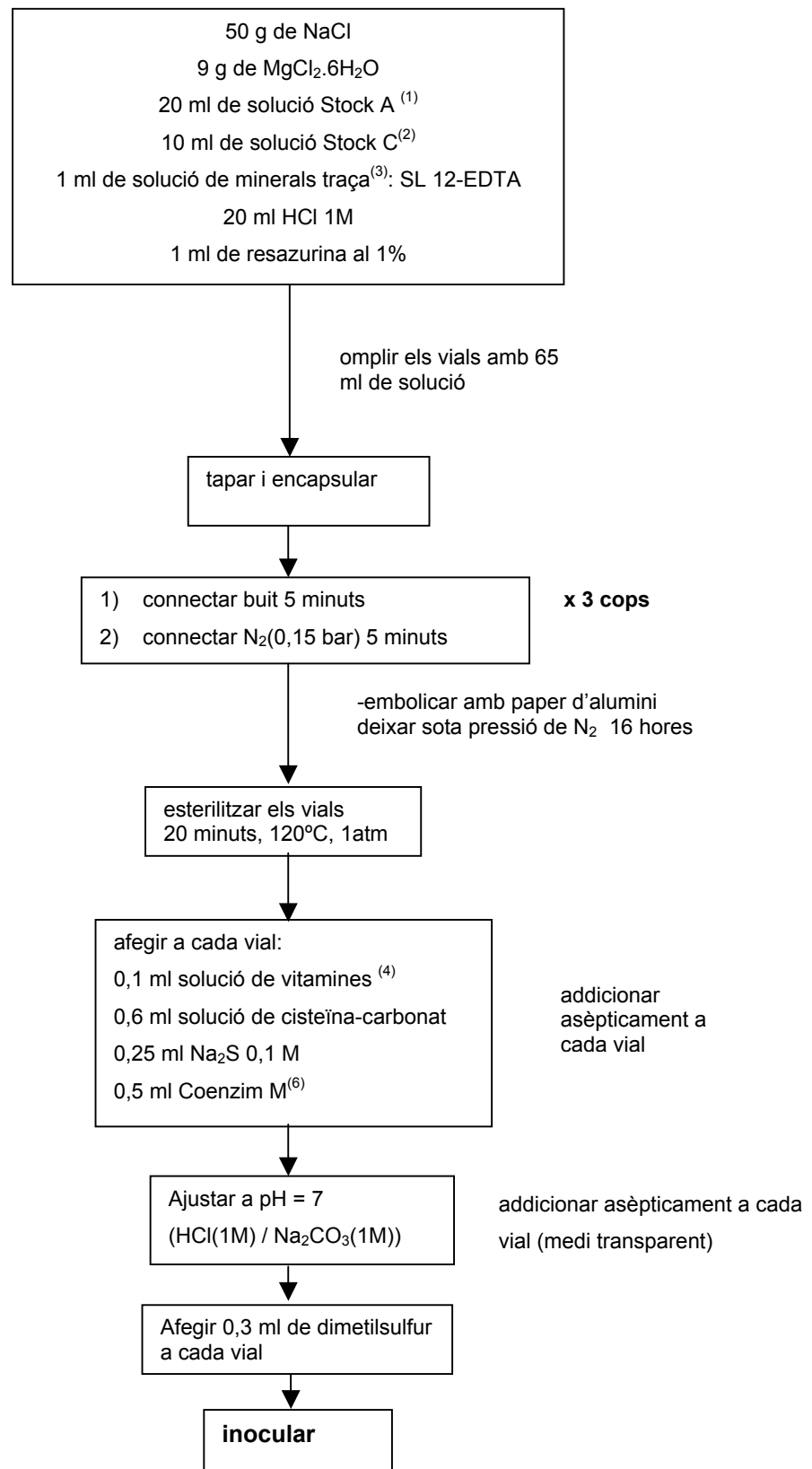
**El fang utilitzat per a l'inòcul prové de la sortida del mig d'un dels dos digestors anaeròbics de l'Estació Depuradora d'Aigües Residuals de Manresa, la mostra va ser guardada a les fosques dins la nevera un dia, abans de fer l'inòcul.**

**Dels sis vials inoculats, tres es cultiven a temperatura ambient (aprox. 20°C) i tres a l'estufa a 30°C. A la taula 3.2 es mostra el pH i la temperatura de cada cultiu.**

Taula 3. 2. pH i temperatura dels cultius enriquits amb dimetilsulfur.

Cultiu	pH	Temperatura
DMS-1	7,1	ambient *
DMS-2	7,0	ambient *
DMS-3	7,1	ambient *
DMS-4	7,0	30°C
DMS-5	7,1	30°C
DMS-6	7,1	30°C

\* aprox. 20°C



**Figura 3.7.** Mètode de preparació del medi en cultius amb substrat dimetilsulfur.

### **Mesura del creixement bacterià**

L'evolució dels cultius d'enriquiment amb dimetilsulfur es va fer analitzant la composició de gasos de la part superior del vial amb cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (**CG-MS**. Fisons MD-800. temperatura injector 200°C, temperatura. forn 50°C, temps: 5 minuts). A continuació s'especifiquen les dades de la columna emprada.

Fase estacionària DB-5MS

Espessor de recobriment: 0,1-15 µm

Longitud de la columna 30 m

Diàmetre interior 0,25 µm

Pressió del gas portador (heli) 2 ml/min

També es va fer l'anàlisi per cromatografia de gasos, tal com es descriu a l'apartat 3.3., al final de l'experiment, per tal de comparar els dos mètodes.

Fins tres setmanes després de l'inoculació, no es va realitzar cap anàlisi per CG-MS, ja que segons Vila (1993) en aquestes condicions el creixement del metanògens és lent, éssent la fase de latència d'uns dos o tres mesos. En les primeres anàlisis, efectuades al cap de 21 i 28 dies després de l'inòcul, els resultats obtinguts van fer sospitar una entrada d'aire a l'aparell, que afectava els nostres resultats, per aquest motiu no es mostren a la present memòria. També cal esmentar que dificultats tècniques amb el cromatògraf van impedir tenir una sèrie d'anàlisis continuades en el temps, per aquest motiu l'última mesura de creixement va ser feta amb molta posterioritat a la penúltima.

### 3.4.2. Resultats

A les pàgines següents ( **figures 3.8 a 3.13**) poden veure's els resultats de creixement per a cada cultiu d'enriquiment en dimetilsulfur, anomenats des de **DMS-1 a DMS-6**.

Cada doble pàgina correspon a un cultiu d'enriquiment, en elles hi ha quatre columnes:

La **primera columna** correspon als cromatogrames de gasos de la fase gasosa del cultiu, a tots ells poden distingir-se dos pics.

Les **columnes segona i tercera** corresponen als espectres de masses del primer i segon pic respectivament, dels cromatogrames de la primera columna. El metà s'ha marcat amb un cercle.

La **quarta columna**, tal com s'indica en el gràfic, mostra els temps des de la inoculació.

A la **taula 3.3** es mostren les relacions metà/nitrogen al final de l'experiment (343 dies després d'inocular) obtingudes per cromatografia de gasos (mateix mètode que a l'apartat 3.3). A la tercera columna també es mostra la proporció de metà al final de l'experiència considerant només els gasos metà i nitrogen, que són els mesurats en les experiències de l'apartat 3.3 de la tesi, per tal de poder comparar les produccions de metà en els experiments dels dos apartats. A la **taula 3.3** s'observa una producció de metà similar a tots els cultius, excepte en el cultiu DMS-4 en el que

la producció és molt superior, superant la quantitat de metà a la de nitrogen. Una explicació possible a aquesta diferència és que aquest cultiu va ser inoculat el primer amb fang molt espès, fet que va provocar l'obturgació i posterior canvi de l'agulla hipodèrmica diverses vegades i que va fer que a la resta de cultius d'enriquiment, l'inòcul de fang fós més clar després d'haver reposat. En els cultius posteriors inoculats a partir de fang de depuradora que es presenten a la memòria s'ha agafat fang no reposat per fer l'inòcul.

**Taula 3.3.** Relacions metà/nitrogen a la fase estacionària dels cultius inoculats amb fang de depuradora amb substrat dimetilsulfur.

<b>cultiu</b>	<b>%CH<sub>4</sub>/%N<sub>2</sub> (CG)</b>	<b>%CH<sub>4</sub><sup>*</sup></b>
DMS-1	0,06	5,7
DMS-2	0,06	5,7
DMS-3	0,15	13
DMS-4	1,27	56
DMS-5	0,07	6,5
DMS-6	0,10	9,1

\*El % de metà presentat aquí es calcula considerant únicament els gasos N<sub>2</sub> i CH<sub>4</sub> per tal de poder comparar els resultats amb els de l'apartat 3.3 en el que es mesuren únicament aquests dos gasos

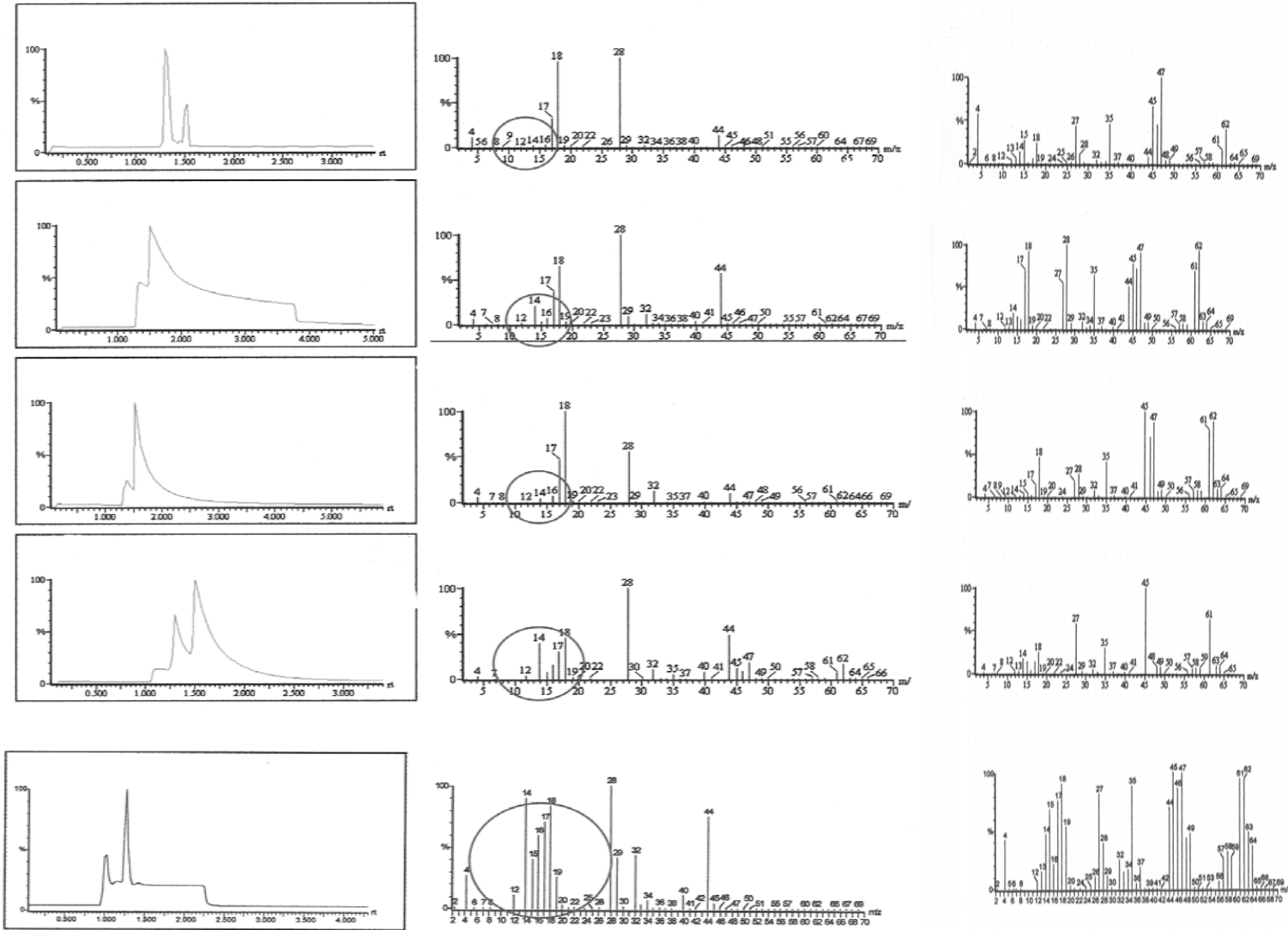


### 3.5. Enriquiment en dimetilsulfur a partir de tapets microbians.

En el present treball s'han realitzat subcultius corresponents a un segon enriquiment en bacteris metanògens. El primer enriquiment, realitzat per Magda Vila, s'inoculà amb *Phormidium valderianum*, procedent de les salines de la Trinitat (Delta de l'Ebre). L'inòcul a partir del medi es va fer a una profunditat de 2 cm, que és on hi ha la màxima activitat metanogènica. (Vila, 1993). Aquests subcultius van ser preparats al laboratori de química ambiental del C I D (C.S.I.C. Barcelona) amb l'assessorament del Dr. Rutger de Wit.

El **mètode** d'obtenció d'aquests cultius ha estat el mateix que el presentat a l'apartat 3.4 de la present memòria.

Els subcultius, van ser **inoculats** amb un 2% de líquid del primer enriquiment. Van fer-se per tal d'analitzar els lípids, per aquest motiu no es va mesurar el seu creixement de manera periòdica. Els resultats de les anàlisis es mostren al capítol 5 de la memòria.



### 3.6. Discussió

#### **Evolució dels cultius d'enriquiment en acetat**

En l'evolució de la proporció de metà d'aquests cultius (**Figura 3.6**), pot veure's que la fase de latència és pràcticament inexistent. Això és degut al fet que els bacteris metanògens consumeixen directament l'acetat. Només hi ha dues espècies que consumeixen acetat *Methanosarcina* i *Methanotrix* (Jetten *et al*, 1992), són els que viuen sobretot a fangs de depuradora que és d'on s'ha tret l'inòcul.

També s'observa que la fase de creixement exponencial, o log fase, és molt similar a tots els vials, com és lògic ja que són rèpliques en les mateixes condicions, i que al cap de 35 dies a tots ells s'ha obtingut una proporció de metà superior al 70 %.

#### **Evolució dels cultius d'enriquiment en dimetilsulfur**

A tots els cromatogrames obtinguts amb CG-MS a cadascuna de les mostres apareixen **dos pics** clarament definits. El primer pic apareix al cap d'un temps de retenció d'un minut i tres segons, el segon té un temps de retenció d'un minut i cinc segons. Aquests temps de retenció tan baixos es deuen a què els compostos estudiats -metà, nitrogen, vapor d'aigua, dimetilsulfur- tenen massa molecular petita.

a) **Primer pic.** En ell s'observen a les primeres anàlisis dos components majoritaris, el **nitrogen** (N<sub>2</sub>, massa molecular 28) i **el vapor d'aigua** ( H<sub>2</sub>O, masses 18 i 17). Aquests resultats concorden amb el fet que els cultius estan en atmosfera de

nitrogen i que el medi és constituït majoritàriament per aigua líquida, que en el vial tancat estableix equilibri amb l'aigua gasosa.

El **metà** ( $\text{CH}_4$ ,  $m/z$  16) apareix, quan és el cas, en l'espectre d'aquest primer pic. Per aquest motiu es centra l'estudi del creixement bàsicament en aquest pic. En aquest sentit es veu que al cap d'uns tres mesos des de l'inòcul apareix un pic de massa 15 que només pot provenir del metà per pèrdua d'un àtom d'hidrogen.

També es veu clarament a tots els cultius **un augment significatiu de la quantitat de metà a l'última anàlisi** feta un any després de l'inòcul. En aquest sentit es pot afirmar que hi ha hagut creixement de bacteris metanògens a tots els vials, malgrat no s'ha pogut tenir l'evolució de metà a la fase exponencial.

Pel que fa a les masses  $m/z$  44 i 16 d'aquest primer pic, corresponen majoritàriament al **diòxid de carboni** ( $\text{CO}_2$ ). Aquest compost pot provenir de la degradació coneguda del dimetilsulfur per part de bacteris metanogènics (**equació 3.2**). S'observa un augment d'aquest compost al llarg del temps, el què hi dóna suport.

L'augment dels pics 34, 33 i 32 amb el temps s'explica per la formació de **sulfur d'hidrogen** ( $\text{H}_2\text{S}$ ) segons l'esmentada equació.

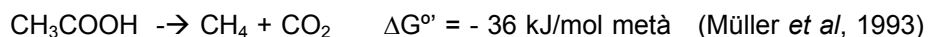
En aquest pic també es detecta l'**aigua**, provinent del medi ( $m/z$  18 i 17) i el **nitrogen molecular** ( $m/z$  28) del medi anaerobi. Les intensitats dels seus pics romanen constants al llarg del temps; en el cas del nitrogen s'explica pel fet que no intervé a les reaccions metabòliques de metanogènesi. L'aigua sí que intervé a la metanització del dimetilsulfur, però a mesura que es consumeix és va vaporitzant fins arribar a la seva pressió de vapor, fet que provoca que aparegui constant a les anàlisis.

b) El **segon pic** correspon a la font de carboni posada com a substrat, el **dimetilsulfur**, pic molecular m/z 62 . La seva presència al cap del vial s'explica per la seva elevada volatilitat.

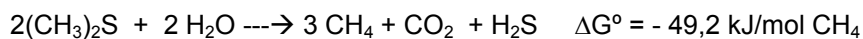
L'**evolució temporal** dels cromatogrames als sis vials és molt similar, per tant pot dir-se que **no es detecten diferències** en els vials cultivats a les temperatures de **20°C i 30°C**.

A la **figura 3.13** pot veure's la proporció de metà de cadascuna de les mostres DMS-1 a DMS-6, mesurada per **cromatografia de gasos**. En ella es veu que totes les mostres generen una quantitat similar de metà, excepte la mostra DMS-4, que té una producció força més elevada. Aquesta diferència també es fa patent en comparar els corresponents espectres de masses de les figures 3.7 a 3.12. Així doncs es veu que **amb tots dos mètodes (CG-MS i CG) pot establir-se l'enriquiment en bacteris metanògens**.

Si es comparen les energies lliures de la **metanització de l'acetat i del dimetilsulfur**:

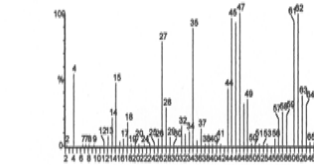
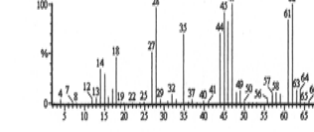
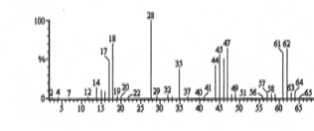
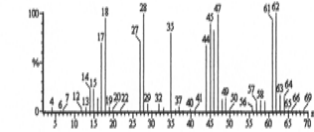
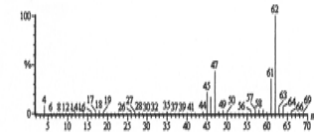
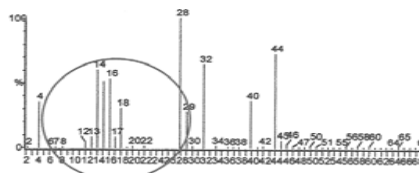
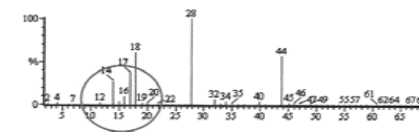
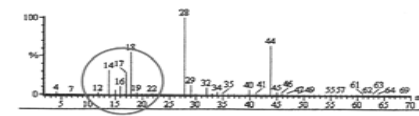
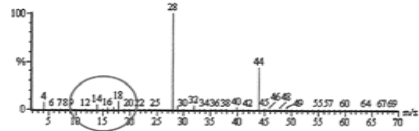
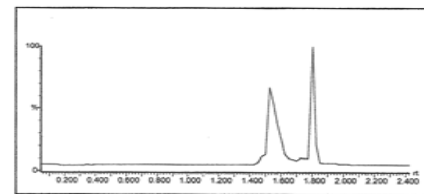
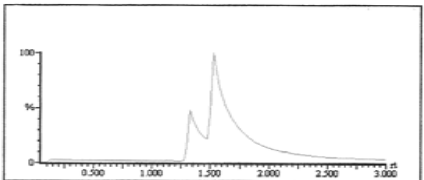
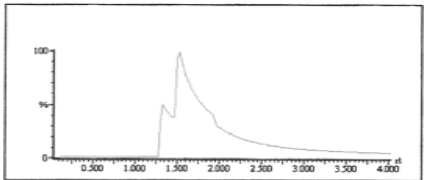
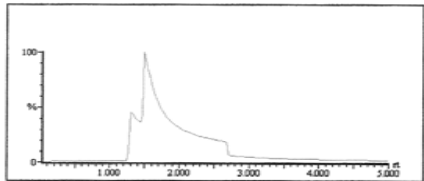
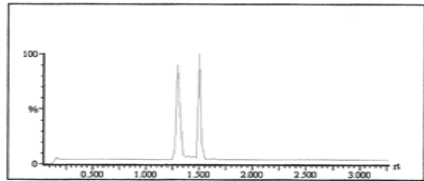


(equació 3.1)



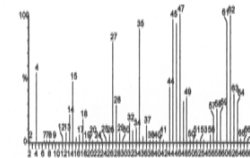
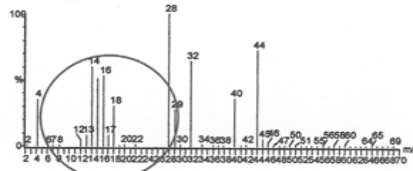
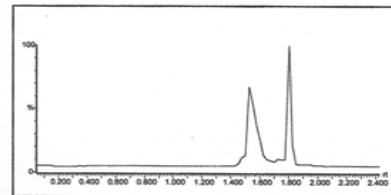
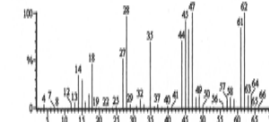
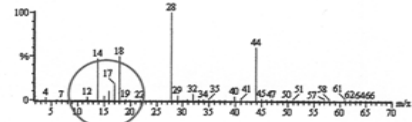
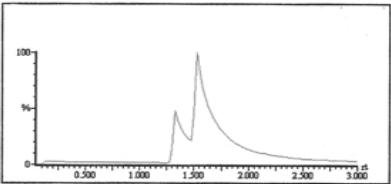
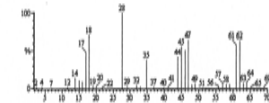
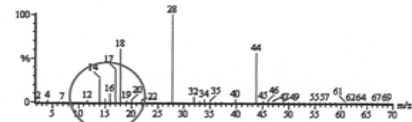
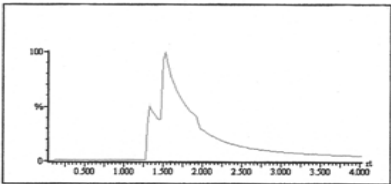
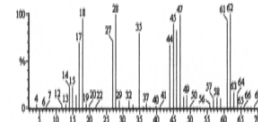
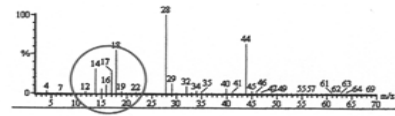
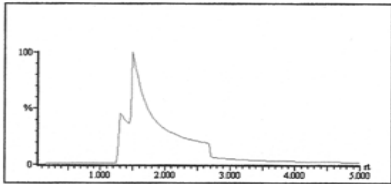
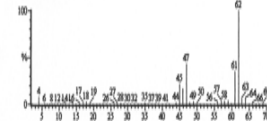
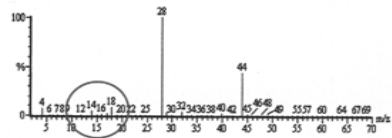
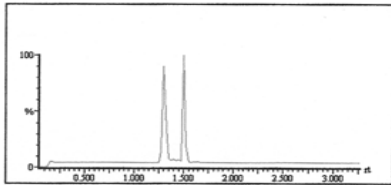
(Finster et al,

1992) (equació 3.2)



s'observa que tot i que el rendiment energètic és menor per a l'acetat que per al dimetilsulfur, en el present estudi s'ha obtingut un creixement més ràpid en els cultius enriquits amb acetat. Aquest fet no s'ha produït en altres estudis on l'inòcul no prové de fang de depuradora sino de tapets microbians (Vila, 1993), en els que els cultius amb dimetilsulfur creixen millor que els d'acetat. L'explicació que es dóna és que el fang emprat com a inòcul està adaptat a l'acetat, ja que funciona de manera continua degradant matèria orgànica, que passa prèviament a acetat que és posteriorment degradat pels bacteris metanògens. És conegut que els bacteris majoritaris presents al fang de depuradora són dels gèneres *Methanosarcina* i *Methanothrix*, els únics capaços de metabolitzar l'acetat. Pel que fa a les espècies de metanògens que metabolitzen dimetilsulfur, han estat descrites en ambients salins i marins com les maresmes, zones intermareals i tapissos microbians d'ambients salins (Oremland *et al*, 1989; Finster *et al*, 1992; Ferry, 1993). Entre elles es troben espècies dels gèneres *Methanlobus* i *Methanosalsus*, metilotròfiques obligades. Un estudi més recent (Lomans *et al*, 1999) descriu l'aïllament d'un nou gènere, *Methanomethylovorans*, que pot créixer degradant dimetilsulfur i també acetat. El fet que l'acetat sigui abundant en els digestors anaeròbics de fang i els resultats dels cultius d'enriquiment en dimetilsulfur del present estudi obre la possibilitat a l'existència, en el fang de depuradora, de bacteris metanògens capaços de metabolitzar acetat i dimetilsulfur. En presència de sulfat els bacteris metanògens són més competitius que els sulfatoreductors pels substrats metilats.

També cal esmentar que no s'efectua el control de l'enriquiment bacterià a partir del diòxid de carboni, present als productes de les dues degradacions, ja que és més soluble en aigua que el metà, i podria quedar dissolt en el medi aquós fent més difícil la seva detecció.





### 3.7. Conclusions

1. S'ha efectuat una posada a punt satisfactòria del laboratori de Microbiologia de l'EUPM per a l'obtenció de cultius d'enriquiment de bacteris metanògens.
2. S'han obtingut cultius d'enriquiment de bacteris metanògens amb substrat acetat a partir de fang de digestor anaerobi de depuradora urbana, en vials tancats i sota atmosfera de nitrogen.
3. Els cultius d'enriquiment de bacteris metanògens inoculats a partir de fang de digestor anaerobi de depuradora amb substrat acetat no presenten fase de latència. El metà generat ha crescut linealment a l'inici (30 dies) esdevenint pràcticament constant després d'aquest període.
4. A tots els cultius inoculats amb fang de digestor anaerobi de depuradora amb substrat acetat s'ha obtingut un rendiment superior al 70 % en volum de metà.
5. S'han obtingut cultius d'enriquiment de bacteris metanògens a partir de fang de digestor anaerobi de depuradora amb substrat dimetilsulfur. L'obtenció de cultius de bacteris metanògens amb dimetilsulfur a partir de fang de depuradora no ha estat descrita anteriorment.

6. No s'observen diferències en la producció final de metà dels cultius d'enriquiment, obtinguts amb substrat dimetilsulfur, incubats a 20°C i a 30°C.
7. Els cultius amb sulfat dimetilsulfur inoculats amb fang de digester anaerobi de depuradora no comencen a produir metà inicialment, sinó que presenten fase de latència.
8. En els cultius degradadors de dimetilsulfur, l'anàlisi dels gasos de la part superior del vial per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses han permès comprovar la degradació del dimetilsulfur a metà, diòxid de carboni i sulfur d'hidrogen. No s'han trobat referències prèvies de l'utilització d'aquest mètode analític en l'estudi de la degradació metanogènica.
9. En les mateixes condicions d'inoculació a partir de fang de digester anaerobi de depuradora, la quantitat de metà generada pels cultius amb substrat dimetilsulfur (56% de metà en el cas més favorable) a la fase estacionària és menor que la generada pels cultius amb substrat acetat (tots superior al 70%) a la mateixa fase.

