

EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN BACTERIANA TOTAL Y METANOGENICA EN EL PROCESO DE CO-DIGESTION ANAEROBIA DE PURINES DE CERDOS

Seradj, A. R.¹, Morazan, H.J.¹, Álvarez-Rodríguez, J.¹, Babot, D.¹, Hermida, B.¹ Yañez, D.R.², Abecia, L.² y Balcells, J.¹

¹Departament Producció Animal, ETSEA. Av. Alcalde Rovira Roure 191; 25198. Lleida. España.

²Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda, 1. 18008 Granada, España.
balcells@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

En función del tipo de poblaciones microbianas que participan en la fermentación anaerobia del purín podemos distinguir tres fases, en la primera las partículas y moléculas complejas son hidrolizadas por enzimas microbianas extracelulares. En este proceso primario de fermentación se producirán una serie de compuestos solubles que, en una segunda fase, serán metabolizados intracelularmente. Oligosacáridos, azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos, son fermentados por la flora acidogénica para producir, principalmente, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, CO₂ e hidrógeno. Finalmente a partir de ácido acético e H₂ se producirá metano (Campos, 2001).

El objetivo del presente ensayo fue analizar la evolución de la población bacteriana total y metanogénica a lo largo del proceso de co-digestión anaerobia de purines de cerdos con sustratos de diferente naturaleza co-inoculados con heces frescas de vaca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de purín (inóculo; 10 % materia seca (MS), elaborado con heces frescas y orina, fue diluido en una solución tampón (Theodorou et al., 1994) (20:80, 40:60 y 60:40, en 60 ml) para obtener tres tipos homogéneos de purín con diferentes concentraciones de MS (2, 4 y 6%, respectivamente). Como co-sustratos se utilizaron 600 mg/botella de tres subproductos agrícolas compuestos por hidratos de carbono de diferente naturaleza: paja de cereal, pulpa de remolacha y de manzana. Finalmente se utilizó como co-inóculo heces frescas liofilizadas y molidas de vacuno lechero a diferentes niveles de inclusión (5 y 10 %, respectivamente). Sustratos e inóculos se aplicaron en un diseño experimental 3x3x2 (3 niveles de MS en el purín x 3 co-sustratos x 2 niveles de co-inóculo). Las heces y orina fueron obtenidas a partir de 4 cerdas adultas, en el primer caso mediante colección directa del ano, en el segundo por masaje vulvar. Tanto en el purín, como en los co-sustratos e inóculos se analizó su contenido en materia orgánica (MO) (550°C/ 3 horas).

La incubación del purín se realizó según el procedimiento descrito por Theodorou et al. (1994). Para ello, en condiciones de anaerobiosis se preparó la solución tampón y se mezcló inicialmente con el purín, manteniendo el medio en agitación constante (flujo burbujeante de CO₂ y un indicador del nivel de reducción) y a una temperatura constante (39 ± 1 °C). Una vez preparado el medio de incubación se trasvasó, manteniendo las condiciones, a las 4 botellas (replicas) de incubación (60 ml) que habían sido llenadas previamente con las cantidades correspondientes de co-sustrato y co-inóculo. Se procedió también al llenado de los blancos. Se definieron como blancos la botellas que contenían una de las siguientes combinaciones, i) tampón+purín y ii) tampón+purín+co-inóculo. Realizada esta operación, se procedió a sellar las botellas mediante séptum de butilo y cápsulas de aluminio en presencia de flujo de constante de CO₂, se liberó la presión, y tras su agitado se procedió a iniciar la incubación en estufa a 39 ± 1 °C.

Durante la totalidad del ciclo de fermentación (56 días) se determinó la producción de gas a partir de la presión (TP704DELTA OHM, Caselle di Selvazzano, Italia) en el espacio de cabeza de la botella, las determinaciones se realizaron diariamente, los primeros 7 días, 2 veces por semana los siguientes 21, para finalizar con mediciones semanales. Adicionalmente al inicio (día 0) y los días 25 y 56 se procedió a la apertura y muestreo de cada una de las botellas para caracterizar la fermentación del purín (por ejemplo, pH, NH₃) y obtener muestras representativas de poblaciones microbianas. Para ello, las muestras del medio (12 ml) se congelaron inmediatamente en N líquido tras su apertura.

En cada muestreo, se determinó la presión, se liberó el gas y una vez restaurada la presión en el espacio de cabeza se procedió a obtener las muestras de metano (CH₄). Dichas

muestras se obtuvieron manualmente mediante jeringuillas de 0,5 ml de precisión. De esta forma se determinó la proporción de CH₄ en el gas producido. El análisis de CH₄ se realizó una columna de conductividad térmica (Agilent Technologies 7890A, Net Work GC System, Perkin Elmer, Boston, EEUU). Las muestras congeladas se liofilizaron y molieron de forma previa a la extracción de ADN. El proceso de extracción se realizó mediante el kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Carlsbad, West Sussex, Reino Unido). Aunque el procedimiento de extracción a partir del QIAamp® proporciona una eficiencia homogénea de lisis celular y calidad ADN, la concentración y la pureza del extracto de ADN se evaluó con nano-gota a partir de las relaciones A260/A280 de los extractos. Para la detección de bacterias totales se utilizaron cebadores específicos del gen 16S rARN (Maeda et al., 2003). Para las arqueas metanogénicas (AM) se utilizaron los cebadores del gen mcrA descritos por Denman et al. (2007). Para cuantificar las copias génicas se emplearon patrones consistentes en extractos del plásmido pCR[®]4-TOPO (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), recombinado con el fragmento diana anteriormente mencionado para cada grupo.

Para el tratamiento de los resultados y su análisis estadístico se procedió a transformar el número de copias de bacterias totales y AM a su logaritmo [log10]. Se determinó también la cuantificación relativa de AM, como la relación entre el número de copias del gen mcrA con respecto al número de copias del gen 16S rARN ($\Delta Ct = Ct\ AM - Ct\ \text{bacterias totales}$).

Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU), utilizando un modelo mixto de medidas repetidas que consideró el tipo de purín, la dosis de co-inóculo, el tipo de co-sustrato y la semana de incubación como efectos fijos, y la botella como efecto aleatorio. Así mismo, se evaluó la asociación entre el número de copias del gen mcrA y la producción de metano en cada semana de incubación con el test de correlación no paramétrico de Spearman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evolución de la población de bacterias totales y de AM difirió en función de la concentración de materia seca (MS) en el purín original ($P < 0,001$). Los purines más diluidos (2% MS) mostraron una menor población de bacterias totales y AM [en la 1ª y 4ª semana], en relación a los purines más concentrados (4 y 6%, respectivamente) ($P < 0,05$). Al final del período de incubación (8ª semana), la población de bacterias totales también difirió entre los purines con mayores concentraciones de MS, así, el número de copias del gen 16S rARN fue superior en el purín con 6% MS que las que se cuantificaron en el purín con 4% MS (logaritmo $6,59 \pm 0,64$ vs. $4,00 \pm 0,59$). Las AM mostraron un comportamiento similar, aunque al final del período de incubación, el número de copias del gen mcrA fue superior en el purín de 6% MS que en el de 4% y 2% MS, respectivamente (logaritmo $3,31 \pm 0,36$ vs. $1,98 \pm 0,34$ y $1,57 \pm 0,34$, respectivamente; Figura 1a).

La cuantificación relativa de arqueas metanogénicas, en relación a la población bacteriana total, fue también modificada por el tipo de purín ($P < 0,01$). A las 4 y 8 semanas de incubación, los purines con un 2% MS mostraban mayores proporciones de AM que las registradas en los purines más concentrados (4% y 6% MS, $P < 0,05$). Ello indicaría que la reducción en la proporción de AM estuvo relacionada inversamente con la dilución del purín.

La adición de un segundo inóculo, en nuestro caso heces frescas de bovino, no indujo ningún tipo de respuesta en los purines más diluidos (2% MS). Sin embargo, en los purines más concentrados (4 y 6 % MS, respectivamente), la adición de diferentes cantidades del co-inóculo dio lugar a una respuesta diferencial. En el primer caso los títulos de bacterias totales y AM disminuyeron mientras que en el segundo se apreció el efecto contrario incrementando las poblaciones totales y la de AM con la dosis de co-inóculo (interacción significativa entre la concentración de MS del purín y la dosis de co-inóculo en el medio, $P < 0,05$).

El uso de co-sustratos (paja de cereal, pulpa de manzana o pulpa de remolacha) en ningún caso alteró la población de bacterias totales, arqueas metanogénicas, ni sus proporciones relativas ($P > 0,05$).

La metodología empleada permitió relacionar la producción de metano (ml/g MS) y los títulos de arqueas metanogénicas. Esta relación fue modificada por la concentración de MS en el purín. Así, en el purín más diluido dicha relación no mostró ninguna tendencia ($P > 0,10$), sin embargo, en los purines más concentrados la relación entre producción de metano y títulos de AM mostró una correlación negativa ($P < 0,01$; Figura 1b).

Nuestros resultados muestran que la dilución del purín redujo los títulos de bacterias (nºcopias/g MS) totales y arqueas metanogénicas durante el proceso de co-digestión. La utilización de un co-inóculo, como las excretas frescas de bovino, sólo mejoró los títulos de bacterias en los purines más concentrados mientras que la adición de co-sustratos (paja o pulpa de remolacha o manzana) en ningún caso alteró la estructura microbiana del medio. La correlación negativa entre la abundancia de AM y la producción de metano sugiere que únicamente algunas especies metanogénicas serían las responsables de la eficiencia energética del proceso de co-digestión, por ello sería necesario profundizar en los estudios que permitiesen aislar y estudiar la funcionalidad de este grupo de arqueas y con ello poder mejorar de la eficiencia energética del proceso de co-digestión del purín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campos, E. 2001. Tesis doctoral. Universidad de Lleida. 394 pp. • Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S. 2007. FEMS Microbiol Ecol 62: 313-322. • Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., Takashiba, S. 2003. FEMS Immunol Med Microbiol 39: 81-86. • Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. Anim Feed Sci Techn 48: 185-197.

Agradecimientos: Estudio financiado por el MCINN (proyecto AGL2010-20820). A.R. Seradj y H. Morazán disfrutaron de becas AGAUR FI-DGR 2011 y MAEC-AECID 2010-2011, respectivamente.

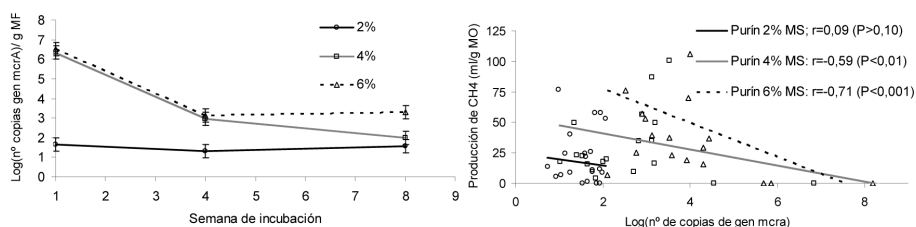


Figura 1. Cuantificación absoluta del número de copias del gen *mcrA* por gramo de materia fresca (MF) en los distintos tipos de purín a lo largo de las semanas de incubación (a) y correlación entre la producción de metano y el número de copias del gen *mcrA* para cada tipo de purín (b)

EVOLUTION OF TOTAL BACTERIA AND METANOGENIC ARQUEAS POPULATION ALONG WITH ANAEROBIC CO-DIGESTION OF PIG SLURRY

ABSTRACT: This experiment studied the effects of slurry concentration (% DM), co-substrate addition and cow faeces as external source of metanogenic Archaea (MA) on “in vitro” evolution of bacterial and MA titres along the anaerobic fermentation of pig slurry (56 day incubation period).. The artificial constructed slurry (10 % DM from fresh faeces and urine) was diluted to 2, 4 and 6% DM using the mineral Theodorou’s buffer. Cereal straw, sugar beet or apple pulp were used as substrates. Methane production was determined by gas chromatography and bacterial titres were determined by quantitative real-time PCR (qPCR). The relative proportion of MA was modified by slurry concentration, being lower in those slurries with high DM content ($P<0.05$). Addition of cow faeces has no effect on the diluted (2 % DM) although it showed a differential response in the concentrated slurries. MA titres were reduced in 4% DM slurry with cow faeces addition whereas the opposite occurred in 6% DM slurry. No substrate effect was detected on MA titres. A negative correlation was detected between methane production (ml/g OM) and MA titres, suggesting that only specific Archaea are able survive and to produce methane on anaerobic slurry fermentation conditions.

Keywords: Pig slurry, co-digestion, methanogenic archaea, qPCR.