

ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES METANÓGENAS EN LA DIGESTION ANAEROBIA DEL PURÍN Y SU RELACIÓN CON EL APORTE EXÓGENO DE CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES O ARQUEAS EXÓGENAS

Seradj A. R.¹, Morazán H.¹, Alvarez J.¹, Abecia L.², Babot D.¹, Yáñez-Ruiz DR.², Balcells J.¹.

¹Department de Producció Animal. ETSEA, Universitat Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191. 25198 Lleida. España. ²Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008, Granada, España
balcells@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El metano (CH₄) procede de la fermentación anaerobia de la materia orgánica (MO) y su toxicidad radica fundamentalmente en la contribución al calentamiento global de la atmósfera (Philippe et al., 2007). Su origen es tan diverso como lo son los ecosistemas naturales en los cuales la MO es fermentada en anaerobiosis. Sin embargo, la emisión derivada de la ganadería tiene dos orígenes principales, la fermentación digestiva (rumen y tracto ceco-colónico) y la emisión procedente de las deyecciones (Flotats et al., 2009). Esta última, debe ser tratada bajo una doble perspectiva, su toxicidad medio ambiental y la posibilidad de fermentar, de forma controlada, la MO a CH₄ (*metanización*). En este último caso el purín puede ser considerado como una fuente potencial de energía renovable (Flotats et al., 2009). La producción de CH₄ obedece a la actuación sinérgica de un consorcio microbiano sobre el sustrato. Una posición crucial en este proceso lo ocupan las arqueas metanógenas cuya actividad conduce a la síntesis final de CH₄. El objetivo del presente ensayo es analizar el efecto de incorporación de carbohidratos y arqueas exógenas sobre la evolución de las principales especies metanógenas y su biodiversidad en la digestión anaerobia de purines de cerdo.

MATERIAL Y METODOS

El purín [inoculo, 4% MS] se preparó a partir de heces frescas obtenidas por extracción rectal y orina extraída por masaje vulvar de cerdas adultas (Centre d'Estudis Porcins Torrelameu, Lleida) recibiendo una dieta comercial. Como co-inóculo (Co-i: fuente exógena de arqueas) se utilizaron heces bovinas liofilizadas. Como sustrato, se utilizaron tres fuentes de carbohidratos estructurales (CHO: Paja de cebada y dos pulpas, remolacha y manzana). La digestión anaerobia del purín (60 ml) se realizó mediante el procedimiento *in vitro* descrito por Theodorou et al., (1994). Se utilizaron tres niveles de co-inóculo (0, 5 and 10% de la MS inicial y 600 mg de los diferentes sustratos (CHO) así como cuatro replicas (botellas) por tratamiento. Las botellas se incubaron (39±1 °C) durante 56 días, la producción de gas se determinó a partir de la presión del espacio de cabeza de las botellas y la concentración de CH₄ por cromatografía de gases. Una réplica de cada botella se abrió a los 0, 25 y 56 días para determinar la concentración de bacterias y arqueas y la biodiversidad de arqueas hidrogenotrofas.

El ADN se extrajo mediante el Kit QIAamp® DNA Stool Mini (Qiagen Ltd, West Sussex, UK). La cuantificación se realizó (qPCR) empleando cebadores específicos de bacterias (Denman y McSweeney, 2005) y arqueas totales (Matarazzo et al., 2011), así como de arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Denman et al., 2007). El ADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría, diluido (de 10⁻¹ a 10⁻⁵) y utilizado como estándar para la cuantificación del ADN bacteriano, arqueas totales y arqueas metanogénicas hidrogenotróficas. La abundancia relativa de los diferentes grupos microbianos respecto a las bacterias totales se realizó a partir del procedimiento descrito por Livak and Schmittgen (2001). Las PCR a tiempo real se realizaron según el procedimiento descrito por Yáñez-Ruiz et al. (2010). Para la DGGE se utilizaron cebadores específicos para arqueas (Cheng et al., 2009). La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturante de urea/formamida (40-60%) durante 16 horas a 80V. La tinción de los geles se realizó utilizando un kit de tinción de plata (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) y tras ser escaneado se analizó utilizando el programa QuantityOne.

RESULTADOS Y DISCUSION

A lo largo del periodo experimental (d0 hasta el d56) la concentración bacteriana disminuyó de forma paulatina (Tabla 1) sin que la adición de diferentes fuentes de CHO alterara, ni la concentración total de bacterias ni su descenso. La adición del Co-i sí alteró la concentración de bacterias totales pero dicho efecto mostró un efecto diferencial entre los dosis de Co-i (Interacción Co-i x Días $P < 0.05$). Efectivamente al suplementar con un 5 %, la concentración de bacterias descendieron (d0 hasta el d25) para mantenerse posteriormente (d56), sin embargo al incrementar la dosis (10 % Co-i) el descenso fue paulatino (hasta el d56) [Interacción Co-i x Día; $P < 0.05$]. El tiempo de incubación redujo también la concentración de arqueas totales ($P < 0.05$) aunque en este caso la reducción observada fue independiente de la adición y dosis de Co-i. Contrariamente a la evolución de las arqueas totales, las poblaciones hidrogenotróficas mantuvieron sus títulos durante el periodo de incubación e incrementaron con la adición y dosis de Co-i ($P < 0.05$). En el análisis de biodiversidad (DGGE) la mayor parte de las bandas se repitieron en el gel lo que reflejaría el origen común de las muestras. No obstante, el patrón de bandas–DGGE mostró que, tanto el periodo de incubación como la presencia del Co-i pueden alterar la estructura de la población como demuestra el dendrograma (Figura 1). La estructura poblacional de arqueas en los diferentes tiempos de incubación (0, 25 y 56 días) fueron más parecidas que las estructuras observadas dentro de cada tiempo de incubación. Es posible que las diferentes especies de metanógenas puedan mostrar diferentes capacidades y eficiencias de adaptación a cambios en el medio (purín) capaces de explicar las diferencias registradas (Dabert et al., 2008). La predominancia de metanógenos hidrogenotróficos en el sistema digestivo de los rumiantes explicó la relación positiva entre los títulos de estas poblaciones y la adición de Co-i al medio, del mismo modo la lenta capacidad de estas especies para adaptarse a cambios en el sustrato (Snell-Castro et al., 2005) explicarían los cambios registrados en sus títulos durante el periodo de incubación. El incremento en la concentración de metanógenos hidrogenotróficos no modificó la producción total de CH_4 pero sí el ritmo al que el valor máximo se alcanzó. Sin embargo, la suplementación con fuentes de carbohidratos estructurales de diferente naturaleza no mostró ningún efecto sobre las poblaciones objeto del presente estudio.

AGRADECIMIENTOS: trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proy. AGL2020-20820). A.R, Seradj ha sido financiado por una Beca AGAUR (FI-DGR 2011)

Tabla 1. Concentración en medio y biodiversidad (DGGE) de bacterias totales, (metanogénicas (AM)) arqueas totales (AT) y arqueas metanogénicas hidrogenotrofas (AMH) registradas al fermentar purín de cerdo en diferentes condiciones

Item	Días			Co-inóculo			SEM	P-Valor		
	0	25	56	0	5%	10%		Día	Ci	Ci x Día
Total bacteria	15.1	4.7	3.1	9.0	7.9	6.0	0.56	**	**	**
AT	0.5	0.3	0.1	0.2	0.4	0.4	0.43	**	ns	ns
AMH	0.1	0.6	0.3	0.0	0.3	0.7	0.16	ns	*	ns
Biodiversidad										
Riqueza	22.7	26.5	25.8	24.7	24.3	26.0	0.48	**	**	**
Indice Shannon	3.1	3.3	3.3	3.2	3.2	3.2	0.02	**	*	**
Uniformidad	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.004	***	*	**

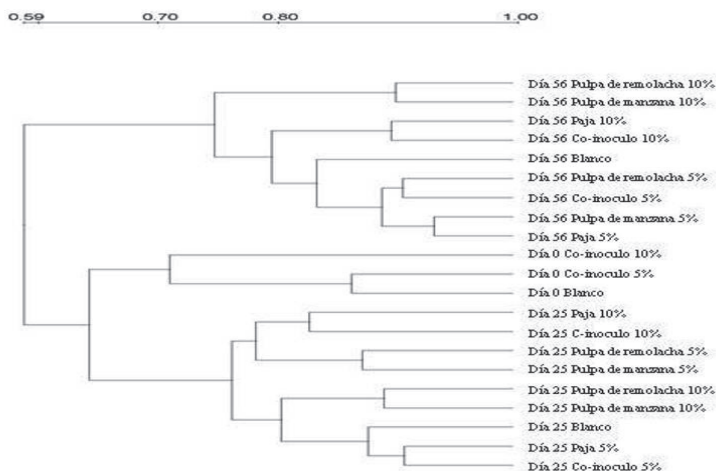


Figura 1. Dendrograma de la población de arqueas obtenido mediante DGGE

REFERENCES

- Cheng, Y.F., Mao S.Y., Liu, J.X., & Zhu, W.Y. 2009. *LettApplMicrobiol*48:585-92. ● Dabert, P., Védrenne, F., BRARD, C., & Béline, F. 2008. In 13th Ramiran international conference, Potential for simple technology solutions in organic manure management, (Albena, France), pp. 96-99. ● Denman, S. E., & McSweeney, C. S. 2005. Quantitative (real-time) PCR. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*, 105-115. ● Denman, S. E., Tomkins, N. W., & McSweeney, C. S. 2007. *FEMS Microbiol Ecol*62: 313-322. ● Flotats, X., Bonmatí, A., Fernández, B., & Magrí, A. 2009. *Bioresource Technology*100:5519-5526. ● Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. *Methods*25:402-408. ● Matarazzo, F., Ribeiro, A. C., Feres, M., Faveri, M., & Mayer, M. P. A. 2011. *J Clinical Periodontology*38:621-627. ● Philippe, F. X., Laitat, M., Canart, B., Vandenheede, M., & Nicks, B. 2007. *Animal*1:1515-1523. ● Snell-Castro, R., Godon, J. J., Delgenès, J. P., & Dabert, P. 2005. *FEMS Microbiol Ecol*52:229-242. ● Yáñez-Ruiz, D. R., Macías, B., Pinloche, E., & Newbold, C. J. 2010. *FEMS Microbiol Ecol*72:272-278.

STUDY OF METHANOGENS POPULATION THROUGH ANAEROBIC FERMENTATION OF PIG SLURRY: EFFECT OF CARBOHYDRATES AND EXOGENOUS ARCHAEAS SUPPLY

ABSTRACT:

Three agricultural by products (CHO:wheat straw, apple pulp and sugar beet pulp) as substrate plus 2 levels of freeze-dried cow's feces (C0-i: 5 and 10 %) as co-inoculum were assigned in quadruplicate during 56 days of in vitro fermentation. Bottles were sampled at days (D) 0, 25 and 56 to determine the evolution of total bacteria, total and hydrogenotrophic methanogens archaea. DGGE was used to study archaea biodiversity in the slurry incubations. CHO addition did not alter bacteria titres but co-i interacts with D ($P<0.001$), in 5% total bacteria decreased significantly (d0 to d25) but remained steady until d56 ($P>0.05$) whereas in 10% titres decrease constantly ($P<0.05$). Incubation time also reduced the titres of archaea ($P<0.01$). However, hydrogenotrophic population maintained titres along incubation period and increased with Co-i ($P<0.05$). Most of the archaeal DGGE bands were observed in all samples, indicating a common bacterial population origin and their structure showed that incubation time and Co-i can modify the clustering pattern.

Keywords: Pig slurry, archaea, hydrogenotrophic methanogens