

Factibility of treat winery wastewater through anaerobic biodigestion with a from cow's waste

**J. Del Real Olvera^{1*}, F. Prieto García^{2*}, E.M. Santos López²,
A.D. Román Gutiérrez² and A.J. Gordillo Martínez²**

¹Facultad de Ingeniería Química, Universidad Veracruzana, Zona Xalapa, Circ. Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Veracruz, México. ²Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5 C.P. 42076, Pachuca, Hidalgo, México.

*jdelreal@uv.mx y prietog@uaeh.reduaeh.mx

Abstract

The anaerobic digestive process is a natural biological process in which an interlaced part of community of bacteria cooperates to obtain stable and auto-regulated fermentation, transforming the residual organic matter into biogas. Four main groups of bacteria coexist in the process, being the most important the methanogenics, one which has their natural origin in the stomach of the ruminants. The aim of this study was to take a microbial from cow to treat a wine distillery wastewater to search whiter degradation of organic matter expressed like COD and generation of biogas. The results demonstrated capacity of degradation of the substrate, decreasing more than half the initial organic content ($56,7 \pm 0,8\%$). On the other hand, the volume of biogas generated by the system at first hours of reaction, were crucial on biodigestion process. Finally, the ratio between biogas and COD indicated that $971,2 \pm 1,4$ mL of biogas was generated per each gram of COD, which such removal a mean an acceptable biodegradation of the winery waste.

Key words: Anaerobic biodigestion, wine distillery wastewater, methanogenics bacteria.

Factibilidad de un sistema de digestión anaerobia en el tratamiento de aguas de proceso de vinazas con microorganismos de rumiantes

Resumen

El proceso digestivo anaerobio es un proceso biológico natural en el que parte de una comunidad entrelazada de bacterias cooperan para lograr una fermentación estable y autorregulada, transformando la materia orgánica residual en biogás. En el proceso coexisten cuatro grupos principales de bacterias, siendo las más relevantes las metanogénicas, las cuales tienen como un medio habitual el estómago de los rumiantes. En este estudio se empleó una comunidad microbiana proveniente del rumen vacuno para investigar la factibilidad de su empleo en la depuración del agua del proceso vinazas provenientes de una destilería, mediante la degradación de la materia orgánica expresada como DQO y la generación de biogás. Los resultados muestran una capacidad de degradación del sustrato, disminuyendo en más de la mitad el contenido orgánico inicial ($56,7 \pm 0,8\%$). Por otro lado, el volumen de biogás generado por el sistema sugiere que las primeras horas de reacción son cruciales para el proceso digestivo. Finalmente, la relación entre el biogás y la DQO indica que por cada gramo de DQO disminuido se generan $971,2 \pm 1,4$ mL de biogás, lo cual representa una muy aceptable degradación del agua del procesos de las vinazas.

Palabras clave: Biodigestión anaerobia, vinazas, bacterias metanogénicas.

Introducción

La depuración de las aguas residuales industriales es sin duda alguna, el segmento de la tecnología del agua que ofrece mayor dificultad y riesgo cuando se intenta definir el sistema de reacción para su tratamiento y asegurar así los objetivos de calidad programados.

Esta dificultad se inicia cuando se intentan establecer las características originales del vertido residual, ya que muchas veces éstas cambian con el tiempo y con las propiedades de la materia prima en proceso. Por esto, se recurre a análisis representativos y mediciones suficientemente válidas como para fijar una base de partida sólida que permita dar una fiabilidad a los cálculos de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) [1].

Habitualmente la depuración de las aguas residuales representa una carga económica para la industria, sin que aparentemente genere beneficio alguno. Ello provoca una fuerte (e incluso excesiva) presión por tratar de minimizar la inversión necesaria para la construcción de un sistema de EDAR. Sin embargo, con la aparición de las normas ISO, la gestión del medio ambiente ha pasado a ser actualmente un activo en la gestión empresarial y de imagen corporativa.

La depuración de las aguas residuales en la industria alimenticia se puede llevar a cabo mediante el empleo de varios sistemas biológicos tanto de manera aerobia como anaerobia [2]. Tal es el caso de los residuos generados por la destilación en la industria alcohólica caen dentro de esta categoría [3], dichos residuos llamados "vinazas", frecuentemente presentan alta carga orgánica (DQO = 20-200 g/L), temperaturas relativamente altas de vertido (50-85°C) y bajo pH (3.5-5.0) [4].

La digestión biológica anaerobia es el método especialmente preferido para su tratamiento ya que ofrece varias ventajas adicionales a los métodos convencionales aerobios, por ejemplo: bajos consumos de energía y pequeñas cantidades de biomasa (bacterias) [3], además de la capacidad de ésta para transformar parte de la polución en metano, el cual puede ser empleado como recurso energético en el mismo proceso de destilación [5-7].

Por otro lado debido a su naturaleza estacional, muchas de estas industrias carecen de comunidades microbianas propias que sean capaces de realizar la digestión anaerobia de manera inmediata, por lo que frecuentemente se requieren de largos periodos de tiempo incubación y adaptación para el arranque de una EDAR [8, 9].

Para evitar los problemas operacionales de las EDAR, se ha propuesto el empleo de varias clases de microorganismos para llevar a cabo la digestión de este tipo de residuos. Así, existen reportados en la literatura diversos tipos de comunidades microbianas analizadas con diferente éxito en el proceso; éstos van desde los lodos activados para tratar aguas municipales [10] y de la industria papelera hasta los provenientes de la industria textil [11] entre algunos otros.

En este mismo contexto, se tiene que las comunidades microbianas provenientes de varios animales domésticos como la vaca, el cerdo, la cabra e incluso el pollo, han sido empleados en los países en desarrollo para tratar de resolver los problemas energéticos [12] ya que al fermentar de manera anaerobia estos microorganismos generan biogás, compuesto principalmente por metano. No obstante a lo anterior, la literatura no reporta el empleo de dichas comunidades microbianas en el tratamiento de aguas residuales derivadas del proceso de vinazas, aun a pesar de reconocer que en muchos casos, la digestión se puede llevar a cabo de forma completa y eficiente [11, 12].

Debido a que en el estómago de los rumiantes, los microorganismos existentes en el fluido ruminal tienen una relación simbiótica que le facilita la digestión de la fibra al animal, la ecología microbial se ve fuertemente afectada por su dieta diaria así como por los complementos alimenticios y los medicamentos suministrados; lo cual dificulta enormemente la caracterización filogenética del consorcio microbiano, ocasionando con esto que la taxonomía del sistema microbiológico sea continuamente modificada llegando incluso a desconocerse casi por completo en los reportes previos. A pesar de lo anterior, las especies bacteriales que con mayor frecuencia son identificadas y reportadas en la literatura para este sistema, se muestran en la Tabla 1 [13].

Tabla 1
Especies frecuentes del rumen

Especie	Consumo	Produce
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CU	S, F, A
<i>Ruminococcus albus</i>	CU, HC	A, F, E
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CU, HC	S, F, A
<i>Eubacterium ruminantium</i>	HC, DX, SU	A, F, B
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	PC	S, F, A
<i>Succinomonas amylolytica</i>	PC, SU	L, A, F
<i>Butyrivibrio pbrisolvens</i>	PC	S, A, P
<i>Selenomonas ruminantium</i>	PC, CU, HC	B, F, A
<i>Megasphaera elsdenii</i>	PC, DX, SU	L, A, P
<i>Lachnospira multiparus</i>	PC, SU	P, A, B
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	PC, SU, DX	L, A, F
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	GL, SU	S, A, F
<i>Clostridium aminophilum</i>	AA	A, S, P
<i>Clostridium sticklandii</i>	AA	Br, A
<i>Wolinella succinogenes</i>	AA	A, B
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H ₂ , CO ₂ , F	CH ₄
<i>Methanosarcina bakeri</i>	H ₂ , CO ₂ , F	CH ₄

CU = celulosa. HC = hemicelulosa. DX = dextrina. SU = azúcar. PC = pectina. GL = licerol. AA = amino ácidos. F = Formato. S = succinato. A = acetato. E = etanol. B = butirato. L = lactato. P = propionato. Br = ácidos volátiles. CH₄ = metano. CO₂ = dióxido de carbono.

Por todo lo anterior, en este estudio se analizó el desempeño de un reactor biológico por cargas en el rango mesofílico de temperatura, el cual emplea una comunidad microbiana metanogénica proveniente del rumen de vaca para la degradación de las vinazas de vino producidas por la industria alcoholera del ron.

Parte experimental

Efluente contaminante

Las vinazas de vino, utilizadas en esta investigación fueron recolectadas de una destiladora ubicada en el municipio de Actopan en el estado de Veracruz, México, la cual utiliza generalmente jugo natural de caña como materia prima para producir alcohol; sin embargo por cosecharse la caña de manera estacional, eventualmente se emplea jugo cristalizado de caña. El vertido contaminante de siete muestras colectadas se

caracterizó como se propone en la literatura [7]; se les determinó pH, temperatura, demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO₅), sólidos totales y volátiles, fósforo y nitrógeno total y fenoles, caracterizándose un total de siete muestras de vinazas. Se pudo verificar que las propiedades del fluido cambian de acuerdo a como lo hacen los insumos empleados.

Inóculo

El cultivo primario de bacterias empleadas en este estudio se obtuvo del rumen de vaca, colectado en el matadero municipal de Jalapa, Estado de Veracruz, México y previamente filtrado a través de membrana de 0,22 micras y centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos. El fluido ruminal tiene un hábitat primordialmente anaerobio, y ya que las bacterias metanogénicas son el paso controlante de la cinética de crecimiento microbiano de dicha comunidad microbiana [11], en este es-

tudio se dejó fermentar al fluido por sí sólo por un lapso de 63 días a temperatura ambiente (25°C), para identificar el inicio de dicha etapa.

Reactor anaerobio

En este estudio se propuso analizar el comportamiento digestivo natural del fluido ruminal sin sustrato, siguiendo el desarrollo microbiano mediante la cuantificación del volumen de biogás generado para identificar así la fase metanogénica del inóculo. Para lo anterior, se introduce en el digestor anaerobio 2,5 L de fluido ruminal diluido al 40% con agua destilada dejando fermentar al sistema en un reactor a 25 ± 2°C por 63 días consecutivos mezclando constantemente para homogenizar el medio.

La oxidación anaerobia se llevó a cabo en un digestor de vidrio de 4 L con agitación, el cual fue operado por cargas a una temperatura de 25 ± 2°C y mezclado a 150 ± 2 rpm tal y como se muestra en la Figura 1. Para iniciar la digestión con células libres, se colocaron 2,5 L de vinaza neutralizada y diluida al 30% en volumen junto con 0,5 L de inóculo metanogénico para iniciar la adaptación. Posteriormente se incrementó paulatinamente la concentración de vinaza hasta llegar a las características de operación de la destiladora en el mismo lapso de tiempo que toma al inóculo llegar a las condiciones metanogénicas.

Los parámetros analizados en el sistema de reacción fueron: a) La cantidad de biogás genera-

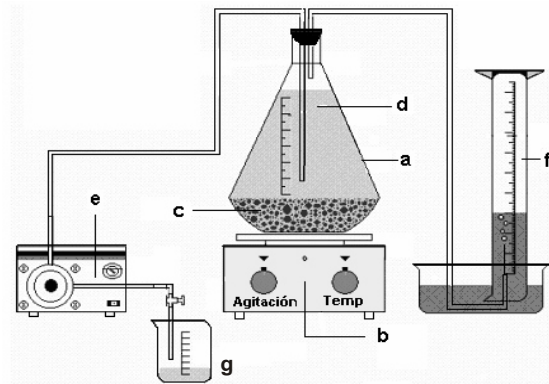


Figura 1. Diagrama del equipo experimental (a) Digestor (b) Parrilla (c) Fluido ruminal (d) Vertido residual (e) Bomba (f) Gasómetro (g) Drenaje de la bomba.

do por el medio, el cual fue medido en mL en un gasómetro por desplazamiento de líquido, b) La demanda química de oxígeno (DQO) mediante la digestión de la muestra de acuerdo con la norma NMX-AA-030-SCFI-2001 [14] y c) el pH del efluente como lo establece la norma NMX-AA-008-SCFI-2000 para asegurar que se trabaja en condiciones metanogénicas [14, 15].

Resultados y Discusión

Siete muestras de vinazas fueron tomadas y caracterizadas; sus parámetros promedios son mostrados en la Tabla 2, donde también se pre-

Tabla 2
Valores promedios de las características de las muestras de vinazas utilizadas

Parámetro	Intervalo	Digerida
pH	4,0-5,5	4,00 (0,02)*
Temperatura (°C)	82,5-86,5	26,30 (0,10)
DQO (mg/L)	12200-63500	39200 (0,12)
DBO ₅ (mg/L)	1201-1280	843 (0,04)
Sólidos Totales (mg/L)	15540-42300	25870 (0,09)
Sólidos Volátiles (mg/L)	1234-3820	2330 (0,02)
Fósforo Total (mg/L)	16,6-65,7	52,35 (0,11)
Nitrógeno (mg/L)	21,3-64,0	35,00 (0,09)
Fenoles (mg/L)	2,80-20,0	9,87 (0,05)
Materia Orgánica (%)	94,9-95,9	-

*Entre paréntesis las desviaciones estándar (n = 7).

sentan los valores para la muestra promedio digerida en este estudio.

Los autores [3] resumen varios de los mecanismos propuestos en la literatura a través de los cuales se puede describir correctamente la oxidación de la materia orgánica empleando una comunidad microbiana. Afirman que la mayoría de los autores coinciden en que existen por lo menos cuatro etapas bien definidas de reacción de acuerdo con los microorganismos presentes en el sistema los cuales son: 1) hidrólisis, 2) acidogénesis, 3) acetogénesis y 4) metanogénesis; dándole a esta última etapa la mayor relevancia por ser la más prolongada en el tiempo y donde ocurren los cambios más significativos de transformación.

Los resultados obtenidos en el comportamiento digestivo natural del fluido ruminal sin sustrato y que pueden ser observados en la Figura 2, sugieren la existencia de varias etapas presentes, según lo señala Carrillo [16], en el transcurso de la reacción. Aquí el volumen de biogás generado se ve incrementado notablemente en la fase acetogénica (aproximadamente de 20-25 días); sin embargo es en la etapa metanogénica (aproximadamente de 30-40 días) donde la cantidad de volumen generado llegó a incrementarse hasta en un $48,38 \pm 1.2\%$ más que la fase anterior, lo que se corresponde con lo reportado por Gavala y colaboradores[3].

A partir de estos resultados, se propone iniciar la reacción fermentativa del vertido contaminante después del día 21 ya que de acuerdo con el

análisis anterior, se estima que es ahí donde se inicia el crecimiento de los microorganismos metanogénicos, para efecto de este estudio se consideró el inóculo después del día 21.

Una vez localizada la fase de interés del inóculo, se procedió a iniciar la digestión de la vinaza. Para esto se inoculó nuevamente el sistema de reacción y se adaptaron los microorganismos a las características del vertido, iniciando el proceso con una concentración del 30% de efluente residual, diluido en agua destilada e incrementando su concentración en proporciones semejantes cada 4 días, con lo que se alcanzan las propiedades originales del contaminante en el mismo lapso de tiempo que le toma a la metanogénesis aparecer (aproximadamente 21 días).

Se analizó la factibilidad del fluido ruminal en los procesos de depuración de vertidos; la degradación del efluente se realizó una vez obtenidas las condiciones adecuadas del inóculo (21 días, a DQO < 50 mg/L). Posteriormente se hizo la cuantificación de la biodegradación de la materia orgánica mediante la variación de la demanda química de oxígeno (DQO) y el volumen de biogás generado como productos de la digestión. En estas condiciones la variación del pH no resultó ser significativo (aproximadamente entre 6,5-7,5) lo que sugiere una estabilidad del proceso. Los resultados obtenidos para el cambio de la DQO se pueden observar en la Figura 3.

El cambio total en la DQO fue del $56,77 \pm 1,4\%$ en 21 días. Es interesante observar que el

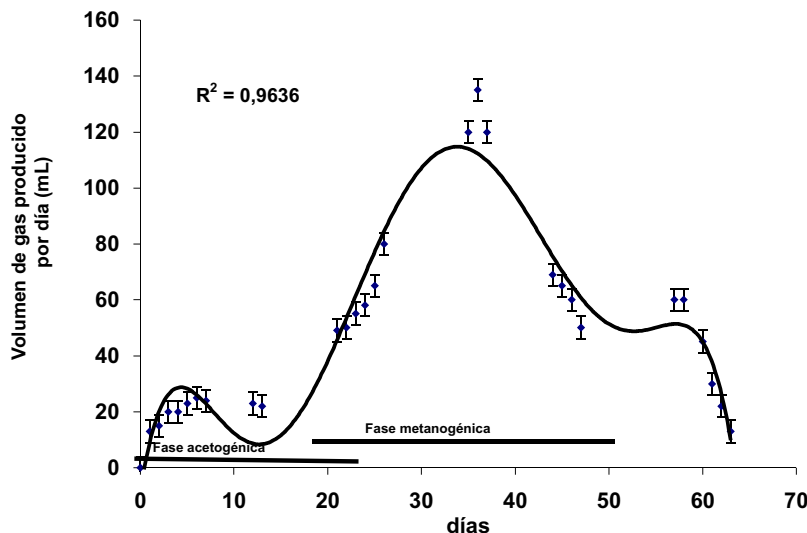


Figura 2. Volumen de biogás producido por el fluido ruminal a través del tiempo.

sistema presentó un período entre los días 8-11 donde los cambios en la DQO fueron importantes, destacando que el mayor de ellos se obtuvo en el día 11 ($7,45 \pm 0,9\%$), según se aprecia en la Figura 3. Dicha disminución tan pronunciada se obtuvo también en las primeras 24 horas de iniciada la digestión ($6,6 \pm 0,8\%$), lo que sugiere una buena respuesta del inóculo frente al sustrato, ya que responde a la remoción de la DQO en valores superiores al 5% en cada día (ver Figura 3). Por otro lado, el comportamiento en la generación de biogás se muestra en la Figura 4.

Para evitar la presurización del sistema, el gas generado fue medido y extraído diariamente. Aquí no debe sorprender el hecho de que la mayor cantidad de gas generado se presentó exactamente los mismos días importantes en los cambios de la DQO, los días 1 y 11. En las primeras 24 horas se generaron 200 mL de gas y el día 11 aportó otros 225 mL, mucho más que la medición anterior, con esto se comprobó que el contenido del birreactor se encontraba en la fase metanogénica.

Las primeras 24 horas de digestión influyen considerablemente en el proceso global de reacción, ya que es ahí donde los cambios son más drásticos y se requiere de por lo menos 10 días más de digestión para que se presenten influencias igualmente de significativas.

Al final, la cantidad acumulada total del biogás generado fue de 19.180 litros (suma de los volúmenes desde el inicio hasta el día 21) lo cual significa que aproximadamente 19.748 g/L de DQO, fueron disminuidos (esta cantidad se corresponde con el valor en el eje de abscisas en el intercepto en el eje de ordenadas de la Figura 5). En la Figura 5 se puede contrastar la cantidad de DQO disminuida (en g/L) y el volumen de biogás generado por el sistema, mediante regresión lineal ($R^2 = 0,9997$). Como resultado calculado, se encontró que por cada gramo de DQO disminuido se generan $971,2 \pm 1,4$ mL de biogás por el sistema. Este valor se obtiene del cociente volumen total de biogás generado/DQO disminuida. Este resultado final respalda favorablemente el hecho de manipular la comunidad microbiana existente en el fluido ruminal para el tratamiento metanogénico de vinazas de vino.

Si comparamos los resultados alcanzados en este proceso con los obtenidos por Pérez [17],

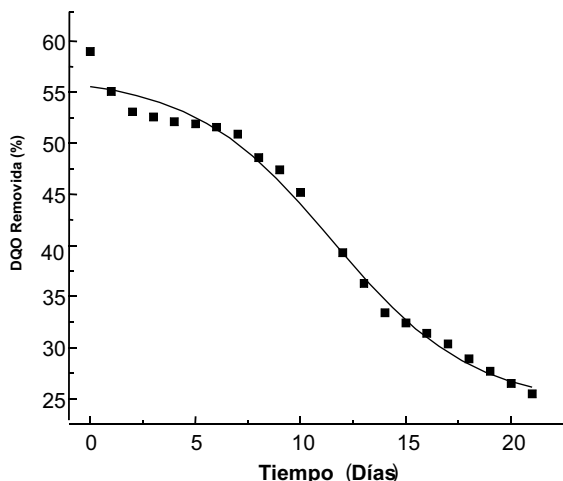


Figura 3. Variación de la DQO removida (%) en el tiempo durante la digestión de la vinaza.

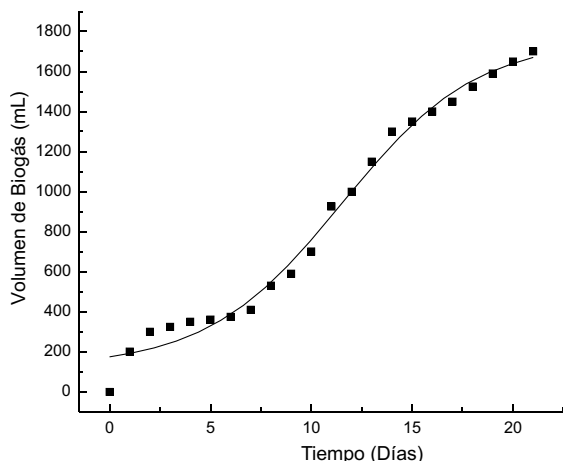


Figura 4. Variación del biogás (acumulado) producido en el tiempo durante la etapa de digestión de la vinaza.

se puede apreciar en la Figura 6 que existe una diferencia en los porcentajes de la DQO removida y el tiempo en que se alcanzan máximas remociones. La cinética obtenida fue de primer orden con un valor para la constante de $0,046 \text{ días}^{-1}$; por su parte Pérez señala una cinética igualmente de primer orden pero con un valor de la constante de $0,098 \text{ días}^{-1}$ [17]. Estos valores de las respectivas constantes se corresponden en una relación 2:1, lo que justifica las diferencias de tiempos en alcanzar máximas remociones de la DQO. Es importante destacar que en la investigación realiza-

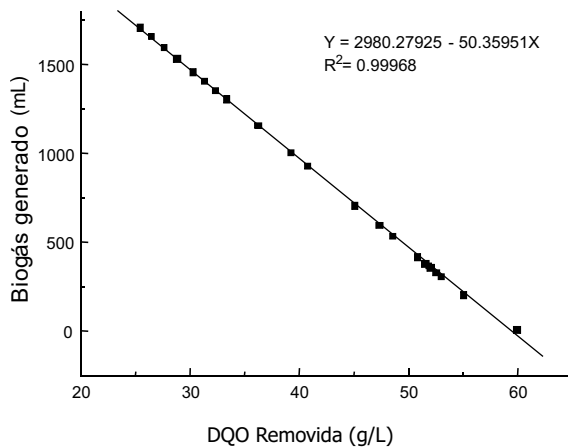


Figura 5. Variación de la DQO (g/L) vs biogás producido (mL) durante el proceso de digestión de la vinaza.

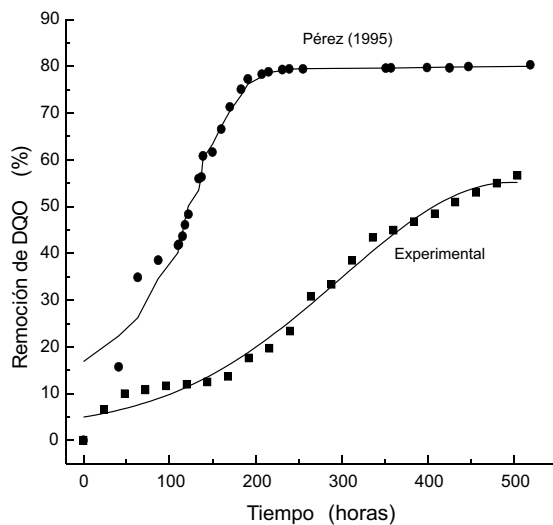


Figura 6. Comparación del porcentaje de remoción de la DQO en el tiempo.

da por Pérez [17], se utilizaron reactores en los que se aplicó la inmovilización de los microorganismos sobre soportes inertes siendo esto una alternativa más exitosa, reconocidos como biodigestores de alta velocidad. En los biodigestores de inmovilización de la flora microbiana, se evitan las pérdidas de ésta por lavado [18]. Comparados con los biodigestores convencionales de biomasa suspendida y por su elevada capacidad de retención de materia, los biodigestores con soportes están favorecidos en términos de: reducción de volumen, incremento en la actividad mi-

crobiana y estabilidad de operación. Por otra parte, la producción teórica de metano (CH_4) es de 350 mL de CH_4 /g de DQO removida; de acuerdo con el volumen obtenido de 971,2 mL, se puede asumir que sólo el 36% del volumen total es de CH_4 , por lo cual resulta un biogás muy pobre en contenido de metano. Esto es indicativo de que los microorganismos metanogénicos no están trabajando a plena eficiencia y en el gas pueden estar presentes otros gases como CO_2 e H_2 . Es sugerente realizar estudios de optimización del proceso.

Conclusiones

Desde hace tiempo se han venido empleando las comunidades microbianas de diversos animales en la generación de metano, para tratar de resolver los problemas energéticos de los países en vías de desarrollo. Sin embargo, muy pocos son los reportes que incluyen este tipo de sistemas microbiales para el tratamiento de vertidos contaminantes. Los resultados aquí obtenidos, confirman que para llegar a la fase metanogénica, el fluido ruminal vacuno se requiere de por lo menos 21 días previos de digestión. Una vez alcanzado dicho estado, los microorganismos son capaces de degradar los contaminantes de las vinazas en más de la mitad de su carga orgánica inicial, llegando a ser de hasta en un $56.77 \pm 1.4\%$ de la DQO en 21 días de digestión continua.

El volumen de biogás generado en la fermentación, confirma nuevamente la importancia que tienen en el proceso los días 1 y 11. En este estudio se comprueba experimentalmente que las vinazas se pueden reducir en un 57% en función de la DQO utilizando material microbiano proveniente del ganado vacuno. Los resultados se pueden extrapolar utilizándose para digerir efluentes en plantas de tratamiento con aguas residuales domésticas.

Referencias Bibliográficas

1. Petruccioli E, Eusebio A., Lageiro M., Federico F., y Cardoso J., Microbial characterisation of activated sludge in jet-loop bioreactors treating winery wastewaters; *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2004) 31: 29-34.

2. Gavrilesco M. y Macoveanu M., Attached-growth process engineering in wastewater treatment. *Bioproc. Eng.* (2000), 23, 95-106.
3. Gavala, H. N; Angelidaki, I. and Birgitte K., Kinetics and Modeling of Anaerobic Digestion Process. *Adv.in Bioch. Eng. and Biotech.* (2003), 81, 58-93.
4. Romero L.I., Martinez de la Ossa E. y Sales D., Microbial purification kinetics of wine distillery wastewaters, *J. Chem. Tech Biotechnol.*, (1990) 58, 141-149.
5. Pérez M., Romero L. I. y Sales D., Thermophilic anaerobic degradation of distillery wastewater in continuous-flow fluidized bed bioreactors, *Biotechnol. Prog.* (1997) 13, 33-38.
6. Rodríguez E. M., Beltrán F. J., Álvarez P. A., García J. F. y Rivas J., Treatment of high strength distillery wastewater (cherry stillage) by integrated aerobic biological oxidation and ozonation, *Biotechnol. Prog.* (2001), 17, 462-467.
7. Beltrán, F. J.; García-Araya, J. F.; Álvarez, P. M. Wine distillery wastewater degradation: 2. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (ozono)-biological treatment, *J. Agric. Food. Chem.* (1999), 47, 3919.
8. Mace S. y Mata-Alvarez J., Utilization of SBR technology for wastewater treatment: An overview, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2002), 41, 5539-5553.
9. Chang, H.T., Parulekar S.J., y Ahmed M., A dual-growth kinetic model for biological wastewater reactors, *Am. Chem. S.* (2004), 45, 234-240.
10. Aivasidis, A. y Diamantis, V., Biochemical reaction engineering and process development in anaerobic wastewater treatment. *Adv. Bioch. Eng. and Biotech.* (2005), 92, 49-76.
11. Borja, R.; Sánchez, E.; Martín, A. y Jiménez, A. M. Kinetic behaviour of waste tyre rubber as microorganism support in an anaerobic digester treating cane molasses distillery slops. *Bioprocess Eng.* (1996), 16, 17-23.
12. Khalil, E. M. y Ezeldin, B. E. Seasonal variation of biogas from three types of animal dung. (2001) Tesis Ahfad University for Women, Omdurman, Sudan.
13. Krause, D. O. y Russell J. B.; How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* (1996), 79, 1467-1473.
14. NMX-AA-030-SCFI-2001. Establece el método de análisis para la determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).
15. NMX-AA-008-SCFI-2000. Establece el método de análisis para la de determinación del pH en aguas residuales.
16. Carillo, L., *Microbiología Agrícola* (2000) Cap. 5 Ed. Limusa.
17. Pérez García M., (1995). Utilización de bioreactores avanzados en la depuración anaerobia de vertidos de alta carga orgánica, Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Cádiz, Pag. 255.
18. Krause, D. O. y Russell J. B.; How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.* 1996 79, 1467.

Recibido el 20 de Marzo de 2006

En forma revisada el 21 de Mayo de 2007