

# **Dinámica de comunidades microbianas presentes en reactores anaerobios de tratamiento de aguas residuales industriales nacionales: un abordaje desde la Biología Molecular**

Callejas, C.<sup>1,2</sup>, López, M.<sup>1</sup>, Castelló, E.<sup>1</sup>, Passeggi, M.<sup>1</sup>, Borzacconi, L.<sup>1</sup>  
Etchebere, C.<sup>2</sup> y López, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Bioprocesos Ambientales (BIOPROA). Fac. de Ingeniería. UDELAR.

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) MEC.

RESUMEN - El tratamiento de efluentes industriales a través de la digestión se ha convertido en una tecnología ampliamente utilizada, debido a las ventajas que ofrece en comparación con los procesos aerobios. La digestión anaerobia puede describirse como un proceso biológico, llevado a cabo por un consorcio de bacterias y arqueas específico, que en ausencia de oxígeno, transforma la materia orgánica contenida en el efluente en productos gaseosos o "biogás" (CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, etc.), productos minerales (N, P, K, Ca, etc.) y compuestos de difícil degradación.

Para estudiar las comunidades microbianas complejas que se desarrollan dentro de los reactores aplicamos técnicas de Biología Molecular como el análisis de fragmentos terminales de restricción (T-RFLP). Mediante esta técnica, extrayendo el ADN de la comunidad, es posible monitorear la respuesta de las comunidades microbianas frente a cambios en el ambiente, como las variaciones en los parámetros de operación o en la temperatura o el pH, entre otros.

La destilación del bioetanol genera un efluente altamente concentrado denominado vinaza. Este efluente tiene una concentración de materia orgánica por lo que es ideal para ser tratado anaeróbicamente. Además de disminuir el impacto ambiental del efluente se puede valorizar el mismo energéticamente recuperando el biogás. Se diseñó y construyó un reactor tipo UASB de 100 m<sup>3</sup> que fue instalado en la propia destilería.

En este trabajo estudiamos la diversidad de bacterias y arqueas presentes en un reactor a escala real, donde se realiza el tratamiento de efluentes de una industria de producción de etanol a partir de caña de azúcar. El reactor fue monitoreado periódicamente en el tiempo durante su arranque y operación (6 meses). Los cambios en la comunidad microbiana se correlacionaron con parámetros de operación para poder entender el proceso.

Palabras clave: *reactor anaerobio, vinaza, gen , T-RFLP*

## **Introducción**

La Digestión Anaerobia se ha desarrollado fundamentalmente en las últimas tres décadas y ha llegado a constituirse hoy en una tecnología fundamental en sistemas de tratamiento de residuos orgánicos (Lettinga, 2001). Ha sido extensamente aplicada al tratamiento de distintos tipos de residuos líquidos (van Lier et al., 2001) y sólidos (De Baere, 2000). Para efluentes líquidos, el desarrollo de esta tecnología ha estado muy ligado a la aplicación del reactor

tipo UASB (*Upflow Ascendent Sludge Blanket*). En efluentes con alta concentración de materia orgánica la importante producción de biogás, posibilita además de la depuración del mismo y la valorización energética del residuo.

La degradación anaerobia es un proceso en el cual la materia orgánica sufre una serie de reacciones secuenciales y en paralelo, llevadas a cabo por distintos grupos de bacterias y arqueas y que culmina con la formación de biogás (formado principalmente por CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>). En ausencia de luz y aceptores de electrones inorgánicos (p. ej. O<sub>2</sub>, NO<sup>3-</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>4+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, etc.), los electrones son transferidos al CO<sub>2</sub>, que es el aceptor final en esta compleja cadena trófica de microorganismos (Schmidell et al, 2007).

Para que el proceso funcione en forma estable debe existir una estrecha cooperación entre los diferentes grupos metabólicos de microorganismos (Arqueas y Bacterias). Es necesario lograr un equilibrio tal entre dichas poblaciones que la producción de metano y la degradación de los contaminantes se mantengan en valores altos de eficiencia, durante la operación (Scmidell et al, 2007).

La incorporación de técnicas de Biología Molecular a estudios microbiológicos de sistemas de tratamiento de efluentes industriales es reciente y ha ampliado de manera importante el conocimiento en el área. El análisis de fragmentos terminales de restricción (T-RFLPs o *Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism*) del gen ARNr de 16S (Liu *et al.*, 1997) permite a través del ADN de la comunidad, monitorear las respuestas frente a cambios en el ambiente, variaciones en los parámetros de operación o en la temperatura y el pH entre otros.

La vinaza es un residuo altamente concentrado producido a partir de la destilación del bioetanol. La composición de este residuo depende de la materia prima empleada así como de los procesos de extracción, fermentación y destilación del azúcar (Willkie *et al.*, 2000; Satyawali, y Balakrishnan, 2008).

Luego de estudios con reactores a escala de laboratorio, nuestro grupo de trabajo diseñó, construyó e instaló en la planta industrial de Bella Unión un reactor UASB de 100 m<sup>3</sup> para realizar una experiencia piloto en condiciones reales de tratamiento de la vinaza. Dado que la producción nacional de bioetanol se realiza zafralmente, el reactor puede operar solamente durante la zafra de producción y permanece algunos meses sin ser alimentado con efluente.

La operación del reactor se realiza a través de una estrategia de alimentación continua, en la cual el arranque consiste en el incremento progresivo de la carga orgánica, lográndose la aclimatación de la biomasa (Odriozola et al.,

2011). En el modo continuo, la historia de la biomasa es un elemento clave para obtener una performance exitosa del reactor (López et al., 2011).

En este trabajo se plantea como objetivo conocer la dinámica de la comunidad microbiana presente en un reactor a escala real diseñado para el tratamiento de vinaza durante su arranque, utilizando técnicas de biología molecular.

### *Materiales y métodos*

Se construyó un reactor de tipo UASB de 100 m<sup>3</sup> y 9 m de altura en material PRFV con aislación térmica de lana de vidrio (Figura 1). El reactor tiene la alimentación en la parte inferior, cuenta con una recirculación para regular la velocidad ascensional de líquido y tiene un sistema de separación de fases en la parte superior, que permite captar el biogás producido. Lateralmente cuenta con siete grifos, numerados de abajo hacia arriba G1 a G7, lo que permiten realizar la toma de muestra a diferentes alturas.



**Figura 1** Reactor UASB de 100 m<sup>3</sup> para el tratamiento de la vinaza, instalado en la planta de ALUR, Bella Unión.

El seguimiento del reactor se realiza monitoreando la Demanda Química de Oxígeno (DQO) a la entrada y a la salida, pH, alcalinidad y ácidos grasos volátiles (AGV), caudal de líquido, caudal de gas y sólidos en entrada y salida, junto con cantidad de sólidos (biomasa) dentro del reactor.

El reactor se inoculó con lodo proveniente de una laguna anaerobia de tratamiento de efluentes de industria frigorífica y la operación comenzó el 10/10/2011. La carga volumétrica aplicada fue variable durante este período, debido a cambios decididos según la estrategia de arranque pero también a variaciones en la concentración de la vinaza. La remoción se mantuvo entre 60 y 70% con cargas aplicadas entre 2.0 y 2.5 kgDQO/m<sup>3</sup>.d.

Se muestreó el lodo periódicamente cada dos semanas tomando muestras de cada uno de los grifos. A cada muestra se le realizó la actividad metanogénica específica (Soto *et al.*, 1993) por triplicado, el contenido de sólidos suspendidos volátiles por duplicado y se analizó la diversidad microbiana mediante T-RFLPs (Liu *et al.*, 1997).

## Resultados

### Actividad metanogénica y biomasa expresada como SSV

La actividad metanogénica específica fue evaluada a lo largo de 64 días a través de ensayos en *batch* de las muestras de distintas alturas en el reactor y a través de la producción de gas directamente en el reactor. Los resultados de la actividad fueron variables a lo largo del período de operación y se encontraron en un rango de 0,05 a 0,4 gDQO<sub>CH<sub>4</sub></sub>. gSSV<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>.

**Tabla 1.** Resultados de algunos de los análisis obtenidos durante el seguimiento de algunos parámetros del reactor. AME: Actividad metanogénica específica, SSV: Sólidos suspendidos volátiles en el reactor, T-RFLPs:

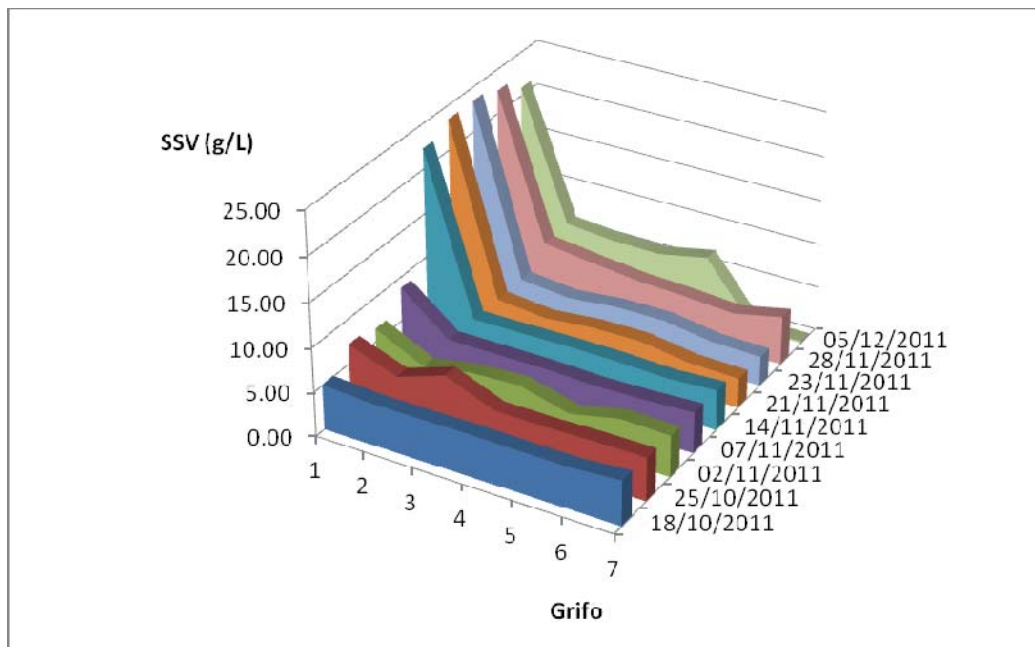
Fecha	Días	AME (gDQO <sub>CH<sub>4</sub></sub> . gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )		Carga orgánica (gDQO <sub>CH<sub>4</sub></sub> . gSSV <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) Reactor	Remoción DQO (%) Reactor	Biomasa (kgSSV) Reactor	TRFLPs Reactor
		Lab ( <i>batch</i> )	Reactor ( <i>in situ</i> )				
17-23/10	8	0,13	0,23	0,29	52	385	-
24-30/10	15	0,10	0,29	0,64	65	438	MEZCLA
31-06/11	22	0,18	0,32	0,56	65	376	-
07-13/11	29	0,14	0,14	0,33	67	400	-
14-20/11	35	0,14	0,14	0,35	58	553	G1, G3, G6
28-04/12 (*)	57	0,11	-	-	-	520	-
05-11/12	64	0,09	0,07	0,34	58	523	G1, G3, G6

(\*) En el período 26/11 al 4/12 no se alimentó el reactor por parada en la refinería.

Los valores de actividad hallados en los ensayos en *batch* fueron comparables con los obtenidos directamente en el reactor piloto a partir del día 29, en los días anteriores la actividad en el reactor fue sensiblemente superior a la estimada en los ensayos en *batch*.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para los ensayos de actividad específica (AME) y la cantidad de sólidos suspendidos volátiles (SSV) obtenidos durante el período de seguimiento de reactor

El perfil de sólidos del reactor se siguió semanalmente y como puede observarse en la Figura 2, al comienzo de la operación el lodo se encuentra mezclado y agitado (hasta por lo menos el 7 de noviembre), por lo que la concentración de sólidos es similar en todos los grifos. A partir del 7 de noviembre (día 29), se produce un aumento en la cantidad de sólidos, fundamentalmente en la base del reactor (G1).



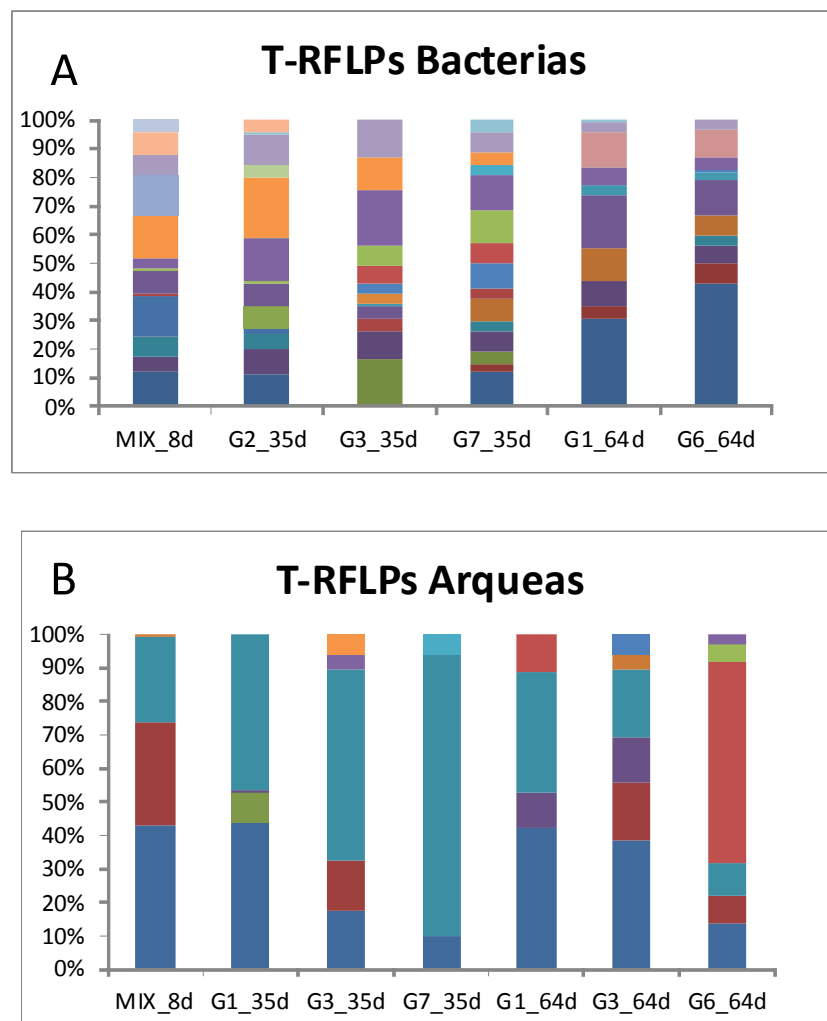
**Figura 2** . Perfil de sólidos a distintas alturas del reactor y durante el tiempo de operación.

#### *T-RFLPs y análisis de agrupamiento*

Se realizó la técnica de T-RFLPs empleando regiones específicas del gen ARNr de 16S de bacterias y arqueas en los días 8, 35 y 64. En el día 8 empleamos una mezcla de lodos de los grifos y en las restantes dos fechas en las cuales se evidenció un gradiente en la concentración de sólidos dentro del

rector (Figura 2), realizamos el análisis de los grifos 2, 3 y 7 en el día 35 y 1, 3 y 6 en el día 64.

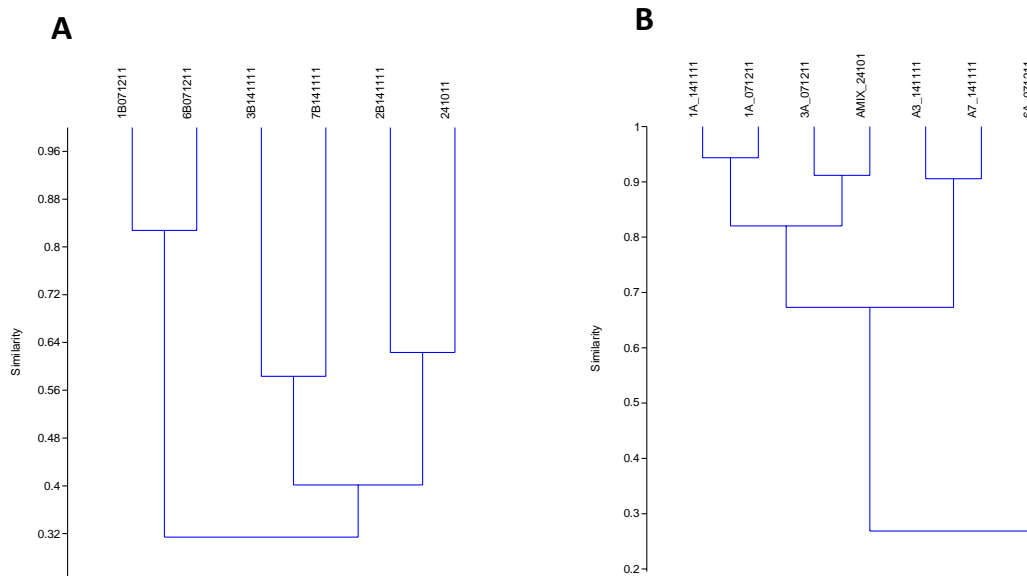
En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para distintos grifos y las distintas fechas. En el gráfico A se muestran las abundancias relativas de los distintos fragmentos obtenidos para las bacterias y el en gráfico B para las arqueas. En el grifo 3 correspondiente al día 64 no logramos amplificar el gen de 16S de bacterias por lo que no se muestran estos resultados. Cada longitud de fragmento se encuentra representada por un color y puede interpretarse como una Unidad Taxonómica Operacional (OTU) o “especie molecular” de bacteria o arquea.



**Figura 3.** Perfiles de T-RFLPs para los distintos grifos analizados (G1, G2, G3, G6 y G7) y los distintos días (día 8=8d, día 35=35d y día 64=64d). Cada color representa la abundancia relativa en porcentaje de un fragmento en pares de bases.

En la Figura 3 se observa que en general, la diversidad de OTUs (o fragmentos) entre las bacterias es superior a la de las arqueas presentes dentro del reactor. Por otro lado, la diversidad de arqueas (gráfico B) es bastante baja, limitándose a algunas pocas OTUs.

Cuando comparamos todos los perfiles obtenidos en dos análisis de conglomerado o *cluster* (Figura 4), observamos que las bacterias agruparían según la fecha, mientras que las arqueas se agruparían respecto a la altura en el reactor o número de grifo.



**Figura 4.** Análisis de agrupamiento de los perfiles de T-RFLPs. El análisis se realizó con el software PAST v2.14 (Hammer *et al.* 2001). A) Bacterias, B) Arqueas.

Asimismo, dentro de las bacterias podríamos establecer dos grupos, las muestras correspondientes al día 64 (grifos 1 y 6 del 7/12/11) que formarían un grupo distinto al resto, más similares entre sí (entre 60 y 70%). Por otro lado, las arqueas compartirían una similitud en un entorno del 65 al 95% en 6 de las 7 siete muestras analizadas (Figura 5 B), este porcentaje es bastante superior a las bacterias que mostraron un rango de entre un 40 a un 80% aproximadamente (Figura 4 A).

## *Discusión y conclusiones*

El reactor comenzó a operar el 10/10/11 con una estrategia de alimentación que implicó la dilución de la vinaza (1:4), para luego ir incrementando su concentración y lograr la aclimatación de la biomasa del lodo. Por problemas operativos y de actividad de la destilería no se alcanzaron condiciones de alta carga en este arranque. La actividad metanogénica del reactor alcanzó un valor de  $0,3 \text{ gDQO}_{\text{CH}_4} \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  durante la primer parte del período de arranque pero disminuyó cuando se bajó la carga aplicada y particularmente luego de una semana en la que no se alimentó por estar parada la destilería.

En el primer período los ensayos en *batch* no reflejarían la actividad *in situ* pues sistemáticamente se obtuvieron valores menores. Teniendo en mente que la vinaza es un residuo con una alta concentración de carga orgánica, entonces una posible explicación de este fenómeno podría ser a través de la contribución la población de bacterias hidrogenotróficas, que serían responsables de aportar una cantidad importante de metano en el reactor cuando éste se encuentra en condiciones de mayor carga y que no actuaría en los ensayos en *batch* que se realizaron únicamente con acetato como sustrato.

En el perfil de sólidos (Figura 2), el crecimiento del lodo en el reactor puede observarse fundamentalmente en el grifo inferior (G1). El comienzo del crecimiento en este grifo puede observarse a partir del día 8 pero se produce un aumento importante a partir del día 35 (14/11/11).

Por otro lado, en el análisis de T-RFLPs observamos que en el reactor las bacterias fueron más diversas que las arqueas, desde el punto de vista de la cantidad de OTUs. Esto se encuentra en concordancia con la bibliografía consultada en la que el análisis de todas las secuencias de ARNr de 16S de bacterias y arqueas provenientes de reactores anaerobios y depositadas en bases de datos públicas, se dividieron en 6000 OTUs de bacterias y aproximadamente 300 de arqueas, evidenciando la baja diversidad de arqueas presentes en este tipo de ecosistema (Nelson *et al.*, 2011).

En base a los perfiles de T-RFLPs hallados y las abundancias relativas de cada OTU, pudimos realizar un análisis de conglomerados (*cluster analysis*) para agrupar las muestras en base a su similitud. Las bacterias se agruparon de acuerdo a la fecha y las arqueas se agruparon más bien según el grifo o altura en el reactor. Estos resultados indicarían que la comunidad de bacterias presentes en el reactor fue cambiando en el transcurso del tiempo del análisis, mientras que las arqueas se habrían mantenido más o menos constantes, con una distribución espacial determinada en el reactor. En este sentido las bacterias al ser más diversas podrían variar la estructura de su comunidad de forma más dinámica que las arqueas, debido a que entre las bacterias podría darse una redundancia de funciones. Las arqueas (población metanogénica) no contarían con esta redundancia funcional y al ser más especializadas y menos



diversas se mantendrían a lo largo del tiempo; además estarían estrechamente relacionadas con la formación de lodo en el fondo del reactor.

El reactor permaneció sin alimentar un período de seis meses (enero- junio de 2012) y actualmente se encuentra en su segundo período de operación. Los resultados de estas etapas están siendo generados y nos permitirán conocer qué sucede con la comunidad microbiana cuando permanece por un período prolongado sin alimentar. A su vez, los resultados de la segunda operación del reactor nos permitirán establecer cuán resiliente es esta comunidad microbiana en cuanto a su capacidad para reponerse a períodos de estrés.

La aplicación de técnicas de microbiología molecular al estudio y monitoreo de reactores, permite responder preguntas asociadas a la dinámica de las poblaciones microbianas, responsables de la degradación anaerobia. A su vez, conocer dicha dinámica permite diseñar estrategias de operación más eficientes.

Agradecimientos: a ALUR y especialmente al personal involucrado en la instalación y operación del reactor, sin cuyo trabajo no se podría haber realizado la presente contribución.

A ANII por haber financiado el Proyecto Fondo Sectorial de Energía "Obtención de energía a partir de vinaza de destilería/FSE17" que financió la construcción del reactor.

## Bibliografía

- De Baere, L. (2000), Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art, *Water Science and Technology*, Vol. 41 n° 3 pp213-222.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Lettinga, G. (2001) Digestion and degradation air for life, *Water Science and Technology*, Vol. 44, n° 8, pp157-176.
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
- López, I., Borges, I., Odriozola, M., Ramos, D., Passeggi, M., Borzacconi, L. (2011) Potassium inhibition in anaerobic treatment of distillery vinasse. En: X Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL), Ouro Preto, Brasil.
- Nelson, M. C., Morrison, M. & Yu, Z. (2011) A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters, *Biores Tech* 102(4), 3730-3739.
- Odriozola, M., Catelló, E., Zinola, D., y Borzacconi, L. (2011) Two starting-up strategies and hydrodynamic behavior of an EGSB treating sugar cane vinasse En: X Latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion (DAAL), Ouro Preto, Brasil.
- Satyawali, Y., Balakrishnan, M. (2008) Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review, *J. of Environmental Management*, **86**, 481-497.
- Schmidell, W., Moreira Soares, H., Etchebehere, C., Menes, R. J., Bertola, N. C. and Contreras, E. M. (Ed) 2007. Tratamiento Biológico de águas residuárias. Editora Tribo da Ilha. Florianópolis- SC. Brasil.
- Soto M, Mendez R, Lema JM (1993) Methanogenic and nonmethanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Water Res.* 27:1361-1376.

- van Lier, J.B., Tilche, A., Ahring, B.K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., Hulshoff Pol, L.W., Lens, P., Vestraete, W. (2001) New perspectives in anaerobic digestion, *Wat. Sci. & Tech.*, Vol. 43, n<sup>o</sup>, 1, pp.1-18.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M. (2000) Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks, *Biomass and Bioenergy*, **19**, 63-102.