



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Título: Comunidades microbianas presentes en reactores anaerobios a escala real: un abordaje multidisciplinar en el tratamiento de efluente lácteo y vinasa

Autora: MSc. M^a Cecilia Callejas

Datos institucionales: PEDECIBA Química, Facultad de Química. Universidad de la República

Montevideo

2017



Título: Comunidades microbianas presentes en reactores anaerobios a escala real: un abordaje multidisciplinar en el tratamiento de efluente lácteo y vinaza

Autora: MSc. M^a Cecilia Callejas

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Doctor en Química en el marco del Programa PEDECIBA.

Directoras de tesis:

-Prof. Titular Dra. Liliana Borzacconi

Dpto. de Ingeniería de reactores, Facultad de Ingeniería- Universidad de la República, Uruguay.

-Prof. Agregado en Investigación, Dra. Claudia Etchebehere

Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Uruguay.

Tribunal:

-Prof. Agregado, Dra. Lilyam Loperena

Dpto. Bioingeniería. Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.

-Prof. Adjunto en Investigación, Dra. Silvia Batista

Unidad de Microbiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable-MEC, Uruguay.

-Prof. Adjunto, Dra. Juliana Calabria

Dpto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, Escola de Engenharia Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Lugar y fecha: Fac. Ingeniería-Universidad de la República. Montevideo, marzo 2017

Agradecimientos

Quiero agradecer a quienes han apoyado de distintas formas la escritura y la realización de la investigación de esta tesis:

A las instituciones que financiaron la investigación y mi beca de doctorado: ANII, PEDECIBA, CSIC, Instituto Clemente Estable y la Universidad Nacional de Irlanda.

A mis dos tutoras Claudia y Liliana por aceptarme para este proyecto, por alentarme e inspirarme con su pasión por la investigación.

A mis compañeros de BIOPROA, especialmente al Dr. Iván López y la Mag. Alfonsina Fernández por los aportes en esta tesis.

A mis compañeros de Cante por alegrarme las jornadas y ayudarme a pensar problemas desde una perspectiva ingenieril.

A Gavin Collins por recibirme en su laboratorio y a la Dra. Estefanía Porca-Belío por su valiosa ayuda en el trabajo laboratorio.

A mi familia que siempre está y que me enseñó lo importante que es soñar y luego trabajar con compromiso para alcanzar esos sueños.

A mis amigos de miércoles por su sostenida contención a través de los años.

Índice de Figuras y tablas

Figuras

Capítulo 1

Figura 1. 1. Esquemas de la digestión anaerobia propuesto A) por McCarty, 1964 y B) en el modelo de digestión anaerobia ADM1 en 2002.....	15
Figura 1. 2. Esquema de las cuatro etapas de la digestión anaerobia mostrando los principales grupos de bacterias y arqueas.....	18
Figura 1. 3. Esquema que muestra las dos posibles vías de formación de metano, metanogénesis acetoclástica o hidrogenotrófica.....	21
Figura 1. 4. Modelos propuestos para la metanogénesis a partir de (A) H ₂ /CO ₂ o (B) acetato en <i>Methanosarcina mazei</i> y (C) metanogénesis hidrogenotrófica sin citocromos.....	24
Figura 1. 5. Resumen de las técnicas disponibles y su alcance para responder interrogantes dentro del campo de la Ecología microbiana.....	30
Figura 1. 6. Química de detección en la qPCR: (izq.) Técnica de SYBR Green I, (der.) sonda Taqman.....	33
Figura 1. 7. Ejemplos de reactores de alta tasa (a) ACP, (b) AF, (c) UASB, (d) EGSB y (e) de membrana acoplada CSTR o AnMBR.....	36
Figura 1. 8. Evolución de las ventas de reactores industriales de tratamiento anaerobio de aguas residuales de las dos mayores empresas internacionales, (A) Paques y (B) Biothane-Veolia.....	37
Figura 1. 9. Respuesta del microbioma a una perturbación..	41
Figura 1. 10. Los indicadores microbianos propuestos se dividen en filogenéticos (superior) y numéricos (inferior). A su vez estos indicadores se elaboraron para el monitoreo de los reactores (izquierda) y para estados denominados de alarma (derecha). Fuente: Carballa <i>et al.</i> , 2015.....	42

Capítulo 2

Figure 2. 1. 16S rRNA gene copy numbers per ng of DNA quantified by qPCR in reactor 1.D (left) and 2.D (right).....	74
Figure 2. 2. Boxplot of the 16S rRNA gene copy numbers per ng of DNA in the samples from the reactor 1.D and 2.D	75
Figure 2. 3. Rooted phylogenetic tree showing representative sequences of methanogenic archaea sequences and the representative OTUs calculated in this analysis.....	79

Capítulo 3

Figure 3. 1. UniFrac Principal Coordinate Analysis (PCoA) showing the similarities between samples, based on OTUs.....	98
Figure 3. 2. Bar charts representing the relative abundance of the different phyla (%) in each sample according to 16S rRNA gene classification of every representative OTU.....	101
Figure 3. 3. <i>mcrA</i> gene copies/ngDNA (bars) and specific methanogenic activity	

(SMA) tests (solid line) in different sludge samples..... 105

Figure 3S 2. Alpha diversity metrics plot.....110

Figure 3S 3. Rarefaction curves, 97% similarity cutoff.....110

Capítulo 4

Figure 4. 1. Principal component analysis showing beta diversity calculated by UNIFRAC. 121

Figure 4. 2. Methanogenic community structure analysed by qPCR of the 16S rRNA gene..... 132

Figure 4. 3. Evolution of total methanogens analysed by qPCR of the *mcrA* gene (bars) and total suspended solids (dashed line) in the reactor. 133

Figure 4S. 1. Alpha diversity metrics plot..... 139

Figure 4S. 2. Rarefaction curves, 97% similarity cutoff..... 139

Capítulo 5

Figure 5. 1. Distribución de las abundancias relativas promedio de los filos principales en el reactor de efluente lácteo (círculo interno) y vinaza (circulo externo)..... 141

Anexo I

Figura AI.I a. Fotografías del lodo proveniente del reactor de efluente lácteo 172

Figura AI. II a. Fotografías del lodo proveniente del reactor de vinaza 175

Figura AI.IV a. Biplot de los perfiles de T-RFLPs para cada muestra analizada (puntos) sin réplicas.. 178

Figura AI.IV b. Perfiles de T-RFLPs del gen *rARN* de 16S de arqueas para disitintas muestras del reactor de vinasa..... 179

Figura AI.IV c. Dendograma calculado con distancia de Bray-Curis para las muestras los perfiles de T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa..... 179

Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1. Estudio de las vías metanogénicas en sistemas anaerobios a escala real y su correlación con parámetros de operación o condiciones ambientales ambientales 34

Tabla 1. 2 Resumen de los reactores estudiados y las principales técnicas empleadas por capítulo.....54

Capítulo 2

Table 2. 1. Operational conditions in the two UASB full-scale reactors..... 70

Table 2. 2.16S rRNA gene sequences from primers and probes sets used in this work..... 71

Table 2. 3. Representative OTUs and their taxonomic assignment by BLAST in

NCBI.....	77
-----------	----

Table 2S. 1 16S rRNA gene copy numbers per ng of DNA quantified by qPCR	86
--	----

Capítulo 3

Table 3. 1. Reactor performance data during the time analyzed.....	97
---	----

Table 3. 2. Specific methanogenic activities (SMA), copies of mcrA gene. ngDNA ⁻¹ and total number of OTUs.....	103
---	-----

Table 3S 1. Alpha diversity metrics. N° OTUs, Observed species, Phylogenetic distance (PD_tree) and Chao1 richness estimator.	110
---	-----

Capítulo 4

Table 4. 1. Performance data of the reactor.....	120
---	-----

Table 4. 2. Selected 'major' phyla (≥ 1%).....	123
---	-----

Table 4. 3. Taxonomic classification of the 20 most abundant bacterial OTU	125
---	-----

Table 4. 4. Classification according to QIIME using RDP database and 1 st hit of BLAST.	131
--	-----

Table 4S. 1. Alpha diversity metrics.....	138
--	-----

Table 4S. 2. mcrA gene copy number per ng of total DNA values, specific methanogenic activity (SMA) and total solids in the reactor	138
--	-----

Table 4S. 3. 16S rRNA gene copy number per ng of total DNA of methanogenic orders.	138
--	-----

Capítulo 5

Table 5. 1. Resumen de algunos parámetros de operación de los dos reactores en fase de arranque	145
--	-----

Tabla 5. 2. Clasificación funcional de algunos de los filos dominantes en los reactores estudiados.	157
---	-----

Anexo I

Tabla AI.I b. Datos de operación efluente lácteo	169
--	-----

Tabla AI.I c. Ácidos grasos volátiles, efluente lácteo.	170
--	-----

Tabla AI.I d. Composición efluente lácteo.....	171
--	-----

Tabla AI.I e. Composición de los principales componentes de la leche.....	172
---	-----

Tabla AI.II a.. Datos de operación reactor vinasa.....	173
--	-----

Tabla AI.II b. Ácidos grasos volátiles	174
--	-----

Tabla AI.II cTabla AI.IIc. Composición distintas vinasa.....	175
--	-----

Tabla AI.III aTabla AI.III. Resumen datos de operación de los reactores.....	176
--	-----

Tabla AI.IV a. Propiedades básicas de la matriz de datos construida con T-Rex	177
Tabla AI.IV b. Índices de similitud calculados para los perfiles de T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa	180
Tabla AI.V a	181
Tabla AI.V b	181
Tabla AI.V c	182
Tabla AI.V d	183
Tabla AI.V e	184

Lista de abreviaciones

ADSGE/SFDA	Actividad de degradación de sustrato graso específica
AGCL/LFCA	Ácidos grasos de cadena larga/Long chain fatty acids
AGV/VFA	Ácidos grasos volátiles/Volatile fatty acid
AHE	Actividad hidrogenotrófica específica
AME/SMA	Actividad metanogénica específica/Specific methanogenic activity
rARN	ARN ribosomal
DA/AD	Digestión anaerobia/ anaerobic digestión
DQO/COD	Demanda química de oxígeno/Chemical Oxygen demand
FISH	Fluorescent in situ hybridization
OLR	Organic Loading Rate/carga orgánica
OTU	Operational taxonomic unit
Q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RDP	Ribosomal Database Project
SAO	Syntrophic acetate oxidation
SAOB	Syntrophic acetate oxidation bacteria
SSV/VSS	Sólidos suspendidos volátiles/Volatile suspended solids
TRH/HRT	Tiempo de retención hidráulico/Hydraulic retention time
UASB	Upflow anaerobic sludge blan

Resumen de la tesis

La digestión anaerobia (DA) es una biotecnología que tiene por objetivo la degradación de materia orgánica y la producción de metano. El proceso es llevado a cabo por un consorcio de microorganismos anaerobios. La DA ha tenido un gran impacto en el tratamiento de aguas residuales con alto contenido en materia orgánica y residuos urbanos, ya que además de tratar el efluente se obtiene energía. En nuestro país se está aplicando esta tecnología en algunas industrias dentro del sector lácteo y de bebidas, entre otros. Si bien la DA es una tecnología consolidada y con gran aplicación, aún se conoce poco la microbiología de estos sistemas en escala real y en particular hay muy pocos estudios de la microbiología de reactores durante su período de arranque. Aprovechando la instalación y puesta en marcha de dos reactores anaerobios en industrias de nuestro país surge esta tesis, en la cual se planteó entre otros objetivos, conocer la dinámica de las comunidades microbianas presentes en dos reactores UASB a escala real durante el período de “arranque”. Ambos reactores fueron inoculados con lodos provenientes de una laguna anaerobia, uno de ellos trató vinaza, generada en la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar y el otro efluente lácteo, rico en grasas. Se estudió la comunidad microbiana en muestras de biomasa colectadas durante aproximadamente un año. Se realizaron análisis fisicoquímicos y se analizó la comunidad microbiana por secuenciación masiva el gen del *rARN de 16S* procariota. Para estudiar la evolución de la población metanogénica se realizaron actividades metanogénicas y se cuantificó por PCR cuantitativo el gen del *rARN de 16S* de arqueas y el gen *mcrA*, un gen funcional marcador de la metanogénesis. Los resultados muestran que en términos generales el efecto del tipo de efluente sobre la selección de los grupos de microorganismos -que luego se volvieron dominantes- fue el fenómeno más evidente. En lo que respecta a los consorcios bacterianos, en ambos reactores dominaron los mismos filos, aunque en distintas proporciones. Los filos *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Synergistetes* y *Verrucomicrobia*, junto con el *cand. phyl. Hyd 24-12* fueron los grupos dominantes luego de la adaptación al efluente lácteo. Los *Clostridiales* fueron un grupo resistente y los *Synergistetes* fueron un grupo resiliente frente a una perturbación fuerte en el pH del reactor que trató efluente lácteo. En el reactor de vinaza los filos *Firmicutes*, *cand. phyl. Hyd 24-12* y *Verrucomicrobia* demostraron ser resistentes a la vinaza y a las cargas orgánicas aplicadas. Por otra parte, la detención de la alimentación del reactor durante dos períodos de aproximadamente cinco meses no afectó a la comunidad microbiana que permaneció en un estado de latencia. Otro objetivo de esta tesis fue determinar cuáles son los grupos de metanogénicos predominantes en reactores a escala real. Este objetivo se fijó para revisar un postulado en la DA en el cual se estableció que el 70 % de la metanogénesis ocurre por la vía acetoclástica y el 30 % por el consumo de H₂ y CO₂. Aunque, datos preliminares de actividades

metanogénicas realizadas en algunos reactores nacionales sugerían lo contrario. En esta parte, se analizaron dos reactores UASB a escala real de la industria láctea, uno de los cuales se encontraba durante su etapa de arranque y el otro durante su 8vo año de operación estable. Se colectaron muestras de biomasa durante aproximadamente un año y se cuantificaron los diferentes grupos de metanogénicos mediante PCR cuantitativo utilizando *primers* y sondas específicos para el gen del *rARN de 16S* de los diferentes grupos. Además se realizaron ensayos de actividad metanogénica a partir de acetato y a partir de H₂ y CO₂. Los resultados moleculares mostraron que las arqueas hidrogenotróficas fueron las dominantes. Estos resultados fueron concordantes con los resultados de las actividades metanogénicas que muestran una mayor actividad hidrogenotrófica. Los *Methanobacteriales* fueron el orden hidrogenotrófico dominante, seguido del orden *Methanosarcinales*. Si bien esto no es una demostración que pueda generalizarse a todos los reactores a escala real, es evidencia de que la dominancia de los acetoclásticos no sería un paradigma sino que se cumpliría en determinadas condiciones ambientales. Conocer las dinámicas de las comunidades microbianas durante períodos tan particulares como la etapa arranque brinda herramientas para poder mejorar dichos tiempos. Esto a su vez impacta en la reducción de costos y por lo tanto en la competitividad económica de la digestión anaerobia frente a otras tecnologías de tratamiento de residuos. Finalmente, los hallazgos de este trabajo fueron fruto del estudio integrando de la Ingeniería y la Microbiología, aplicado a los reactores. Esta tesis profundizó el entendimiento entre las dos áreas del conocimiento, empleando un seguimiento sistemático y a escalas reales.

Palabras claves: *digestión anaerobia, comunidades microbianas, efluente lácteo, vinaza, secuenciación masiva, Q-PCR, 16S, mcrA*

Thesis Summary

Anaerobic digestion (DA) is a biotechnology in which organic matter degradation and methane production is achieved. The process is driven by a consortium of anaerobic microorganisms. The DA had a great impact in the treatment of wastewater with high content of organic matter and urban waste as well. In addition to treating the effluent, energy is obtained. In our country, this technology is being applied by some industries such as the dairy and beverage industries, among others. Although DA is a well-established and widely applied technology, the microbiology of these systems is still poorly known. There are very few microbiological studies of reactors during their start-up period. This thesis arises by taking advantage of the installation and start-up of two anaerobic reactors in local industries. Among other objectives, the dynamics of the microbial communities present in two full-scale UASB reactors during the start-up was analyzed. Both reactors were inoculated with sludge from an anaerobic lagoon, one of those treated vinasse, generated in the production of bioethanol from sugar cane and the other, a fat-rich dairy effluent. The microbial community was studied in samples of biomass collected during approximately one year. Physicochemical analysis were performed and the microbial community was analyzed by massive sequencing of prokaryotic 16S rRNA gene. To study the evolution of the methanogenic population, methanogenic activities and quantitative PCR of 16S rRNA gene from methanogens and *mcrA* gene, a functional gene marker of methanogenesis were performed. Roughly, the effect of the wastewater type seemed to be the main factor on the selection of the different microbial groups, which later on became dominant. Regarding bacterial consortia, both reactors were dominated by the same phyla, although in different proportions. The phyla *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Synergistetes* and *Verrucomicrobia*, together with the *cand. Phyl. Hyd 24-12* were the dominant groups after adaptation to milk effluent. *Clostridiales* were a resistant group and *Synergistetes* were a resilient group against a strong perturbation in the pH of the reactor that treated dairy effluent. In the vinasse reactor the phyla *Firmicutes*, *cand. Phyl. Hyd 24-12* and *Verrucomicrobia* were resistant to vinasse and to the applied organic loads. On the other hand, a stop in the reactor feed for two periods of approximately five months did not affect the microbial community that remained in a latency state. Another objective in this thesis was to determine the predominant methanogenic groups in real-scale reactors. This objective was set to review a postulate in the AD in which it was established that 70% of the methanogenesis occurs by the acetoclastic route and 30% by the consumption of H₂ and CO₂. Although, preliminary data of methanogenic activities carried out in some local reactors suggested the opposite. In this part, two real-scale UASB reactors from dairy industry were analyzed, one of them was during its start-up phase and the other during its 8th year of stable operation. Biomass samples were collected for approximately one year and the different methanogenic groups

were quantified using quantitative PCR using primers and probes specific for the *16S rRNA* gene of the different groups. In addition, methanogenic activity assays were performed, using acetate and from H₂ and CO₂. Molecular results showed that hydrogenotrophic archaea were dominant. These results were in agreement with the methanogenic activities that showed a greater hydrogenotrophic activity. The Methanobacteriales were the dominant hydrogenotrophic order, followed by the order *Methanosarcinales*. Despite being a general demonstration for all real-scale reactors, these results evidence that the dominance of acetoclastics would not be a paradigm but would occur under certain environmental conditions. To know the dynamics of microbial communities during peculiar periods as the start-up, provides tools to shorten the time required. This in turn reduces the economic cost, improving the competitiveness of anaerobic digestion compared to other waste treatment technologies. Finally, the findings of this work were the result of the study integrating Engineering and Microbiology, applied to the reactors. This thesis deepened the understanding between the two areas of knowledge, using a systematic and real scaling.

Keywords: anaerobic digestion, microbial communities, vinasse, dairy wastewater, high-throughput sequencing, qPCR, 16S, mcrA

Tabla de contenido

Agradecimientos	i
Índice de Figuras y tablas	ii
Figuras	ii
Tablas.....	iii
Lista de abreviaciones	vi
Resumen de la tesis	vii
Thesis Summary	ix
Tabla de contenido	1
CAPÍTULO 1: Introducción general	5
Tratamiento de efluentes industriales y obtención de biogás: un sistema sustentable	7
1.2 Perspectiva histórica de la digestión anaerobia	8
1.3 Bioquímica y microbiología de la digestión anaerobia.....	14
1.3.1 Hidrólisis.....	15
1.3.2 Acidogénesis.....	17
1.3.3 Acetogénesis	18
1.3.4 Metanogénesis	21
1.4 Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de las comunidades anaerobias	25
1.4.1 Secuenciación del gen <i>rARN de 16S</i>	26
1.4.2 Metagenómica	27
1.4.3 Metatranscriptómica	28
1.4. 4 Metaproteómica y metabolómica	29
1.4.5 Técnicas de marcado isotópico	30
1.4.6 Hibridación fluorescente in situ (FISH)	31
1.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	32
1.5 Tipos de reactores	35
1.5.1 Configuraciones de reactores anaerobios	36
1.5.2 Reactores de flujo ascendente UASB.....	37
1.6 Indicadores y predicciones a partir de las comunidades microbianas.....	39
1.7 Problemas detectados en reactores UASB	44
1.7.1 Granulación.....	44
1.7.2 Problemas de sedimentación	45
1.7.3 Problemas de inhibición.....	45
1.8 Problemas de hidrólisis en efluentes lácteos.....	46

1.9 Problemas asociados al tratamiento de la vinaza.....	47
1.10 Limitaciones e interrogantes abiertas en el conocimiento	48
1.11 Alcance de la tesis y objetivos.....	50
1.12 Hipótesis y objetivos.....	52
1.12.1 Hipótesis.....	52
1.12.2 Objetivos generales	53
1.12.3 Objetivos específicos	53
1.12.4 Organización de la tesis	54
1.13 Referencias	54
CAPÍTULO 2: Comunidades metanogénicas en reactores de efluente lácteo.....	64
Resumen del capítulo 2	65
Abstract	67
2.1 Introduction	68
2.2 Materials and methods.....	69
2.2.1 Full scale reactor's sample collection	69
2.2.3 Clone libraries and sequence analysis	72
2.2.4 Specific methanogenesis activity (SMA) tests.....	73
2.3 Results and Discussion.....	73
2.3.1 Methanogenic Archaea monitoring by qPCR	73
2.3.2 Dominant methanogenic Archaea groups in the reactors.....	76
2.3.3 Specific methanogenic activity tests	80
2.4 Conclusions	82
2.5 References	83
2.6 Supplementary material	86
CAPÍTULO 3: Reactor efluente lácteo	87
Resumen del capítulo 3	88
Abstract	90
3.1 Introduction	91
3.2 Materials and Methods	94
3.2.1 Full-scale UASB reactor description and sludge sampling	94
3.2.2 Physicochemical properties and methanogenic activities.....	94
3.2.3 DNA extraction, sequencing, and bioinformatics.....	94
3.2.4 Quantitative PCR	95
3.3 Results and discussion	96
3.3.1 Performance during intermittent start-up.....	96
3.3.2 Microbial structure and dynamics.....	97

3.3.4 Monitoring methanogenic community by <i>mcrA</i> gene quantification	103
3.4 CONCLUSIONS.....	105
3.5 REFERENCES.....	106
3.6 Supplementary material	110
CAPITULO 4: Reactor de vinaza	111
Resumen capítulo 4.....	112
Abstract	114
4.1 Introduction	115
4.2 Materials and methods.....	117
4.2.1 Reactor operation and monitoring.....	117
4.2.2 Sample collection DNA extraction and sequencing.....	118
4.2.3 Sequence analysis.....	118
4.2.4 Quantitative PCR (qPCR)	118
4.3 Results and discussion	119
4.3.1 Microbial consortium present in the reactor	119
4.3.2 Dynamics of relevant bacterial groups in the reactor	126
4.3.2 Environmental distribution of dominant OTUs.....	130
4.3.4 Methanogenic community.....	131
4.4 Conclusions	133
4.5 References	134
4.6 Supplementary material.....	138
CAPITULO 5: Discusión general, conclusiones y perspectivas	140
5.1 Principales hallazgos.....	141
5.2 Arranque y performance de los reactores.....	142
5.3 Comunidades metanogénicas.....	145
5.4 Bacterias presentes en los reactores: estructura y funciones potenciales	152
5.5 Correlaciones entre parámetros de operación y grupos microbianos.....	158
5.6 Conclusiones	161
5.7 Perspectivas	163
5.8 Referencias	165
ANEXO I.....	168
AI.I Reactor efluente lácteo	169
AI.II Reactor de vinasa.....	173
AI.III. . Resumen datos de operación de los reactore	176
AI.IV. Análisis de T-RFLPs.....	177
AI.IVa. T-RFLPs de bacterias de los dos reactores.....	177

AI.IVb. T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa	179
AI.V Correlaciones reactor de vinasa	181
AI.VI Análisis bibliotecas de clones de rARN de 16S de arqueas	185
ANEXO II.....	193
AII.I.DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE MEZCLAS GASEOSAS SIN HIDRÓGENO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA	194
AII.II DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA..	198
AII.III. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS Y SÓLIDOS SUSPENDIDOS EN EFLUENTES LÍQUIDOS .	203
AII.IV. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGENICA ACETOCLÁSTICA	206
AII.V. DETERMINACIÓN DE DQO POR MÉTODO DE REFLUJO CERRADO.....	211
AII.VI. ANÁLISIS QIIME PARA ION TORRENT	214
AII.VII. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE BIBLIOTECAS 16S CON MOTHUR	217

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

“The implementation of Anaerobic wastewater treatment represents perhaps a very small step in the direction of more sustainability, but it is an essential step. It also will push other developments in society to more sustainability, viz. it will contribute to achieve more self-sufficiency in society such as in food production, to more problem directed policies and to more public awareness. And with that it will contribute to the development of a less “stressed” society, a society in which more priority will be put on essential things for mankind, such as the development of the talents of all individuals. This will lead to what man ultimately hankers for, real happiness.

But in the short term it will contribute to improve the public awareness, a process that already takes place.”

Gatze Lettinga, 2001

Tratamiento de efluentes industriales y obtención de biogás: un sistema sustentable

El tratamiento de efluentes industriales resulta de gran importancia debido a los efectos contaminantes que genera su disposición al ambiente si no es tratado. Se denomina efluente industrial a las descargas residuales derivadas de los vertidos originados por distintos usos del agua industrial, por ejemplo, refrigeración, producción de vapor, recirculación de aguas de proceso, aguas de condensados y limpieza de equipos entre otros.

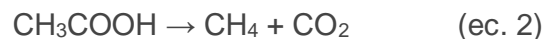
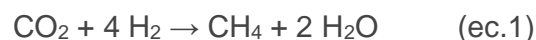
En el presente, son varias las industrias que han incorporado plantas de tratamiento de efluentes, con la intención de preservar las condiciones ambientales y cumplir con la normativa vigente. En Uruguay, el Decreto 253/79 (y sus modificaciones) del Poder Ejecutivo, contiene las pautas para control de contaminación de aguas, por ejemplo los límites de vertido. Luego, el artículo 21 de la ley N° 17.863 o Ley General de Protección de Medio Ambiente, con fecha 28 de noviembre de 2000 declaró: “de interés general la protección del ambiente contra toda afectación que pudiera derivarse del manejo y disposición de los residuos, cualquiera fuera su tipo, a cuyos efectos han de regularse la generación, recolección, transporte, almacenamiento, comercialización, tratamiento y disposición final de los residuos.”

Los sistemas de tratamiento biológico de remoción de materia orgánica pueden ser aerobios o anaerobios. En sistemas de tratamiento anaerobio, es posible además de la remoción de materia orgánica, la generación de biogás, una fuente de energía renovable. Esto resulta de gran importancia ya que nuestro país tiene metas concretas para disminuir la importación de energía y combustibles fósiles. Si bien el potencial de generación de biogás a partir de residuos en Uruguay no sería una parte importante dentro de la matriz energética (López, 2016), podría verse como una práctica de desarrollo sustentable.

En este sentido, el tratamiento de residuos tanto agroindustriales, como residuos sólidos urbanos cobra una marcada importancia, porque además de tratar el residuo eliminando la contaminación, se puede obtener energía durante el proceso. Dicha energía puede ser utilizada dentro de la propia industria, generando así un sistema sustentable, donde los costos de la misma son reducidos o en caso de una sobreproducción ser ingresada a la matriz energética del país. El avance del conocimiento científico y tecnológico acerca de los procesos que ocurren en las transformaciones biológicas de materiales orgánicos permite hoy plantearse el desafío de buscar soluciones económicamente viables apuntando a la obtención de energía.

1.2 Perspectiva histórica de la digestión anaerobia

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 CH₄ y CO₂). En ausencia de luz y aceptores de electrones inorgánicos (p. ej. O₂, NO₃⁻, Fe³⁺, Mn⁴⁺, SO₄²⁻, etc.), la materia orgánica se oxida y reduce al CO₂ o en el caso del acetato una parte de la molécula se oxida (grupo carboxilo) y la otra se reduce (grupo metilo). El metano sería entonces un producto “residual” del metabolismo energético de algunos anaerobios. La producción de metano a partir de moléculas orgánicas podría resumirse en las siguientes ecuaciones (ec. 1 y ec. 2) :



La historia del descubrimiento de la metanogénesis puede consultarse en algunos textos como Baker, 1956, Ferry, 1992, Marchaim, 1992 y Abbasi *et al.*, 2011. Los primeros registros científicos fueron hacia finales de 1700, cuando

Alessandro Volta escribió en una carta a un amigo con fecha 14 noviembre de 1776 un inesperado descubrimiento. El científico observó la formación de cantidades sustanciales de “aire combustible” produciéndose en lagos, estanques y arroyos cercanos al lago de Como. La observación inicial la realizó en el lago de Verbano, Volta observó que para detectar la aparición del gas solo era necesario disturbar el fondo de los sedimentos, tras lo cual una lluvia de burbujas emergía hacia la superficie.

Luego, reconoció una estrecha relación entre la abundancia del gas combustible y la cantidad de restos vegetales en el sedimento. Colectó muestras de gas de varios sitios y determinó la proporción relativa de gas y aire que daría la explosión más vigorosa. El conocimiento de la química en 1776 no permitió a Volta caracterizar el gas inflamable que había encontrado en sus observaciones. El primero en lograrlo fue William Henry en 1806, que encontró que el gas era aparentemente idéntico al gas de coque empleado para la iluminación y lo llamó metano. Luego, otros científicos eminentes como Bunsen y Boussingault se interesaron en la formación de metano y corroboraron los hallazgos de Volta (Marchaim, 1992).

Sin embargo, no fue hasta un siglo después que este fenómeno se vinculó a un proceso microbiológico. Esto sucedió en 1868, cuando Bechamp, un estudiante de Pasteur realizaba una serie de experimentos en los cuales observaba la descomposición del almidón y azúcar en un medio inorgánico simple, suplementado con tiza y en condiciones de ausencia de oxígeno. Bechamp observó la aparición de metano y logró aislar de los cultivos, un organismo fermentador que nombró como *Microzyma cretae*. La descripción del organismo fermentador que logró aislar en dichas condiciones fue vaga, destacando su tamaño, muy pequeño y móvil (con el mayor aumento del microscopio se veía como un punto). Lamentablemente, el trabajo de este estudiante no tuvo demasiada incidencia entre la comunidad de investigadores de la época (Abbasi *et al.*, 2011).

Un trabajo más riguroso que demostró la naturaleza microbiológica del proceso fue publicado por Tappeiner en 1882. En su experimento montó tres

cultivos anaerobios con restos vegetales como sustrato y contenido intestinal de rumiantes como inóculo. Luego, sometió cada cultivo a distintos tratamientos; al primer cultivo le agregó un antiséptico para inhibir las bacterias, al segundo lo hirvió para matarlas y el tercero no fue sometido a ningún tratamiento. Como resultado, solo el cultivo sin tratar produjo metano, demostrando así que la fermentación se daba por microorganismos (Abbasi *et al.*, 2012).

Hacia finales de 1800, la formación de metano estaba centrada en la fermentación a partir de celulosa como sustrato y comenzó la elucidación de la bioquímica involucrada. Hacia 1899 Omelianski logró aislar organismos que producían H₂, ácido acético y butírico en base a experimentos con celulosa. Más adelante en 1910, Soehngen confirmó estos resultados y postuló que las reacciones de fermentación de los compuestos complejos se daban por reacciones de oxidación-reducción para formar hidrógeno, dióxido de carbono y ácido acético. Luego, los trabajos de Buswell en los años 30' (1936a,b) llevaron a un mejor entendimiento de los procesos de control y el balance de masas entre la composición de los sustratos y la producción de metano.

La teoría de la “reducción del dióxido de carbono” se postuló en 1934 por van Niel, quien más tarde descubrió las reacciones de la fotosíntesis, y sostenía que la oxidación del acetato debería resultar en la remoción de átomos de hidrógeno y que el metano resultaría como consecuencia de una combinación con dióxido de carbono, que serviría de aceptor final de electrones. Esta teoría fue apoyada por H. A. Barker, estudiante de grado en microbiología de van Neil, quien pasó una temporada en un laboratorio de la Universidad de Delft, Holanda, aislando los primeros metanogénicos y publicó dos trabajos en 1936. En ellos se postulaba que todo el metano se formaba a partir de la reducción de dióxido de carbono en una ecuación análoga a la generalizada para la fotosíntesis (Barker, 1936a,b).

Aunque, en 1948 dos ingenieros sanitarios Buswell y Sollo que trabajaban en Estados Unidos, echaron por tierra la hipótesis de Barker. En su trabajo (Buswell y Sollo, 1948) empleando una técnica nueva para la época, basada en trazadores marcados con ¹⁴C, demostraron que la formación de metano a partir

de acetato no ocurría a través de la reducción de CO_2 sino por una descarboxilación simple de la molécula, en la cual el metano se producía a partir del grupo metilo y el dióxido de carbono a partir del grupo carboxilo.

Estos resultados luego fueron verificados en el laboratorio de Barker por otros investigadores (Stadtman & Barker, 1949; Pine & Barker, 1956) dejando la teoría de la “reducción del dióxido de carbono” como poco probable e inclinando las ideas de la época a la hipótesis de la descarboxilación.

En 1965, Jeris & McCarty, empleando marcadores radiactivos, encontraron que el 70% del metano resultante de la fermentación de la mayoría de los compuestos orgánicos ensayados o de una mezcla de estos compuestos, provenía del acetato, el cual a su vez era un intermediario en la vía. Este trabajo fue uno de los mojones que dio origen al concepto actual de que la vía dominante de producción de metano ocurre por la vía acetoclástica.

Simultáneamente a estos trabajos fisiológicos, otra línea de investigación intentaba aislar organismos metanogénicos, con grandes dificultades, debido al escaso conocimiento del metabolismo anaerobio en esa época. Los trabajos pioneros de Baker en la década de 1940 llevaron a lograr aislar un microorganismo capaz de oxidar etanol a acetato y metano, nombrado como *Methanobacterium omelianski*. Luego, en 1950 Hungate desarrolló las técnicas que permitieron el aislamiento de una cantidad de bacterias capaces de convertir H_2 y CO_2 a CH_4 . Aunque, las bacterias capaces de convertir propionato, butirato y ácidos grasos a acetato y metano no lograron aislarse con esta nueva metodología, empezándose a desarrollar la hipótesis de que un único organismo no sería capaz de realizar dichas transformaciones.

De este modo, comenzaron a conducirse experimentos para demostrar la teoría de los múltiples organismos. En 1967, Bryant publicó un trabajo clave en el cual demostraba que el cultivo original de *M. omelianski* contenía en realidad dos especies. A partir del aislamiento de las dos especies demostró que una convertía etanol en acetato y otra convertía dióxido de carbono y el hidrógeno liberado en la etapa anterior en metano. Así se reconoció que la oxidación

completa a compuestos simples era fruto de la acción coordinada de distintas bacterias y comenzaron a descubrirse los distintos grupos tróficos que conocemos actualmente. Así, las bacterias aisladas de digestores anaerobios pueden ser clasificadas en al menos cuatro grupos tróficos según el sustrato que utilicen (Imhoff, 1938) a saber, a) las hidrolíticas y fermentadoras, b) las acetogénicas productoras de hidrógeno, c) las homoacetogénicas y d) las metanogénicas.

Finalmente, la relación de sintrofia entre las bacterias productoras de H₂ del segundo grupo y las consumidoras del tercer grupo ha sido otro de los hallazgos importantes en esta trama trófica. Los trabajos de Speece (1964), Lawrence (1969) y Thauer *et al.* (1977), fueron importantes para demostrar este tipo de relación ecológica.

Simultáneamente a la fructífera investigación en torno a la metanogénesis a partir de celulosa hacia finales de 1800, comenzaba el desarrollo de la tecnología de “tanques septicos” para el tratamiento de aguas servidas por un inglés de apellido Cameron. El gobierno local de la ciudad de Exeter, Gran Bretaña, comenzó a tratar todas las aguas servidas con esta tecnología con el beneficio de que el biogás colectado era empleado para el alumbrado público. De todos modos, los avances en la microbiología y la bioquímica del proceso avanzaban en paralelo al desarrollo de la tecnología. Recién a partir de la década de 1950 comenzó la transferencia del conocimiento básico hacia aplicaciones en el tratamiento de residuos municipales e industriales (Abbasi *et al.*, 2011).

Los trabajos de Stander, 1950 demostraron la utilidad de retener la biomasa metanogénica dentro del reactor, separándola de la corriente del efluente y reduciendo en consecuencia los tiempos de retención. A partir de estas investigaciones se diseñó el “clarigestor”, un reactor para el tratamiento del efluente de la industria de vinos que poseía un tanque de sedimentación superior para el retorno de sólidos y biomasa al reactor. Y ya en 1979, Lettinga incorpora la separación del gas y los sólidos dentro del reactor en el diseño de los reactores de alta tasa como el *Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB)*, en el cual el tiempo de retención celular se desacopla del tiempo de retención hidráulico.

Es decir, que la materia orgánica presente en el efluente es degradada a medida que atraviesa el manto de lodos que permanece en el reactor. Desde el punto de vista de la ingeniería del sistema, este diseño logra una serie de ventajas como la aplicación de una alta carga orgánica por unidad de volumen, la especialización de los organismos retenidos en el reactor y la integración de zonas de reacción y separación de fases (sólido, líquido y gas), integradas en una misma unidad.

A partir de esta época la tecnología anaerobia para el tratamiento de residuos tanto municipales como industriales se afianza, sobre todo en Europa. Este desarrollo se vio impulsado en gran medida por un incremento marcado en el precio de los combustibles fósiles durante dicho período y al incremento en el control de la contaminación por regulaciones ambientales cada vez más exigentes. Por otro lado, en los países en vías de desarrollo la utilización de biogás como energía es una práctica antigua que aún se emplea, India y China los países con los mayores programas de producción de biogás a nivel mundial. A excepción de estos dos grandes países y de otros del sureste asiático, en el resto del mundo la producción de biogás se emplea más como una estrategia de tratamiento de residuos con un alto contenido en materia orgánica, que como fuente de energía.

En Uruguay, se ha realizado la evaluación del potencial de producción de biogás a partir de residuos agroindustriales a escala nacional (López, 2016). El estudio concluye que en la situación actual, se puede lograr cubrir un 1,3-2,1% de la energía primaria total. Además, debe sumarse al ahorro energético que implica esta tecnología en comparación con los sistemas aerobios.

El desafío actual que enfrentan los investigadores en el área de la degradación anaerobia de residuos es ir reduciendo la brecha entre el conocimiento ingenieril de la tecnología y los fenómenos biológicos que suceden dentro de las plantas de biogás. Esto implica que el conocimiento irá avanzando en la medida en que se profundice el trabajo interdisciplinar para poder optimizar la operación y predecir los distintos sistemas en función de cambios en el

ambiente.

1.3 Bioquímica y microbiología de la digestión anaerobia

Los sistemas de reacciones químicas en un reactor anaerobio son complejos e involucran una serie de pasos que pueden dividirse en dos grandes categorías:

- Reacciones bioquímicas: Estas reacciones son catalizadas por enzimas intra o extracelulares de los organismos presentes en los lodos (bacterias, arqueas, hongos, protozoarios, etc.) y que actúan sobre el pool de materia orgánica biológicamente disponible. La desintegración de los compuestos (biomasa muerta) a material particulado y la subsecuente hidrólisis enzimática, a sus monómeros solubles, son procesos que se dan extracelularmente. Luego, la degradación de compuestos solubles ocurre intracelularmente y resulta en el crecimiento de la biomasa y el subsiguiente decaimiento celular.
- Reacciones fisicoquímicas: Estas reacciones no son catalizadas biológicamente e implican asociaciones y disociaciones iónicas y transferencias de masa gas-líquido. Estas reacciones escapan a la temática del trabajo y si bien es importante tenerlas presentes, no se profundizará en el tema. Para consultar literatura específica se recomiendan el siguientes trabajo (Batstone *et al.*, 2002).

Originalmente la digestión anaerobia se describió en tres grandes etapas; i) hidrólisis del material complejo, ii) producción de ácidos por fermentación y iii) metanogénesis (McCarty, 1964). A modo anecdótico, en este trabajo aún no se conocían las arqueas como dominio filogenético distinto al de las bacterias -que recién fue publicado en 1977 por Carl Woese- por lo que los autores se refieren a los metanogénicos como «un grupo de bacterias estrictamente anaerobias». Luego del trabajo revolucionario de Woese acerca de la organización filogenética de la vida, los metanogénicos fueron reevaluados, presentándose como un grupo distante a las bacterias pertenecientes al dominio de las Arqueas (Balch *et al.*, 1979).

Actualmente, las reacciones involucradas se conocen con bastante profundidad. Se ha llegado a establecer un modelo matemático (ADM1) que simula la degradación anaerobia con parámetros cinéticos específicos para distintas sustancias involucradas en las reacciones, considerando 7 grupos metabólicos de microorganismos distintos (Batstone *et al.*, 2002). En la Figura 1.1 se muestra la evolución de los esquemas de DA en el tiempo.

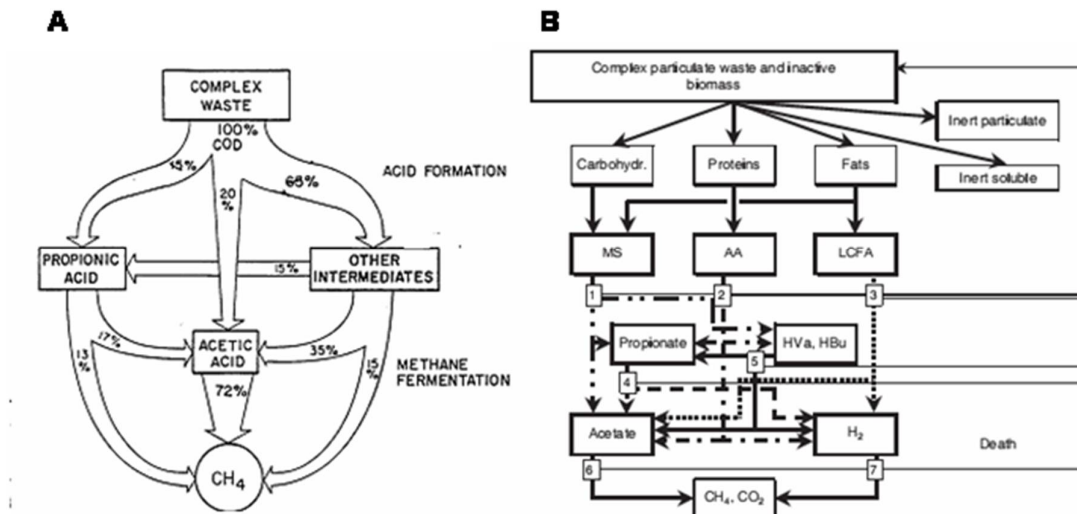


Figura 1. 1. Esquemas de la digestión anaerobia propuesto A) por McCarty, 1964 y B) en el modelo de digestión anaerobia ADM1 en 2002.

A continuación se describe cada una de las cuatro etapas principales (Figura 1.2) de la digestión anaerobia, junto la reacciones de oxidación sintrófica de acetato y la homoacetogénesis, así como los microorganismos que participan en ellas:

1.3.1 Hidrólisis

Como se describió anteriormente, el material particulado primero es desintegrado a sus polímeros, es decir, polisacáridos, proteínas y lípidos y material inerte soluble. Luego, estos polímeros son hidrolizados a sus monómeros. Espontáneamente, esta etapa es llevada a cabo por un grupo de

bacterias, denominadas en su conjunto como «bacterias hidrolíticas». Este grupo de bacterias presenta una gran diversidad de afiliaciones taxonómicas y metabolismos, lo cual explica el amplio espectro de sustratos orgánicos que pueden ser degradados.

Estos organismos secretan distintas enzimas hidrolíticas como celulasas, xilanasas, amilasas, proteasas y lipasas, entre otros. Se han propuesto dos mecanismos: i) la secreción directa de enzimas hidrolíticas por los microorganismos hacia el licor, lo cual rompe los fragmentos en sustancias solubles (Jain *et al.*, 1992) y ii) los microorganismos se adhieren a la superficie de los fragmentos de sustrato y secretan enzimas que hidrolizan las partículas solubilizando sustancias (Vavilin *et al.*, 1996).

Si bien ya se han aislado una gran variedad de organismos hidrolíticos, aún no se conoce en profundidad como participan y que mecanismos llevan adelante en los reactores anaerobios. Las bacterias hasta ahora descritas pertenecen a los phyla *Firmicutes* (géneros: *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter*, *Butyrivibrio*, *Acetivibrio*, *Halocella* y *Eubacterium*), *Bacteroidetes*, *Fibrobacter*, *Spirochaetes* (*Spirochaeta*) y *Thermotogae* (géneros: *Fervidobacterium* y *Thermotoga*) (Azman *et al.*, 2015). Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los más comúnmente encontrados, mientras que miembros pertenecientes a los filos *Fibrobacter*, *Spirochaetes* y *Thermotogae* son menos frecuentes.

Algunos hongos anaerobios (phylum *Neocallimastigomycota*) también participan en esta etapa pero debido a que su crecimiento es más lento que el de las bacterias, se encuentran en baja abundancia. Por esta razón se les ha asignado un rol poco relevante (Azman *et al.*, 2015). Algunos géneros descritos incluyen miembros encontrados en el rumen como *Orpimomyces*, *Anaeromyces*, *Piromyces* y *Caecomycetes*. Recientemente se ha desarrollado toda un área de investigación en torno a este grupo de organismos dado su potencial para mejorar la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos, los cuales resultan muchas veces recalcitrantes a la batería enzimática de origen bacteriano (Dolhofer *et al.*, 2015).

En general, la hidrólisis se considera el primer paso limitante de la digestión anaerobia, ya que muchas veces la solubilización de los biopolímeros de las partículas puede llevar tiempos de residencia considerables. El ejemplo más claro es el tratamiento de residuos celulósicos, que precisan tiempos de residencia mayores a aquellos efluentes en los cuales la materia orgánica ya se encuentra soluble o al menos en suspensión.

1.3.2 Acidogénesis

En esta etapa los monómeros (azúcares y aminoácidos) son fermentados a ácidos volátiles de cadena corta (VFAs), hidrógeno molecular y dióxido de carbono que a su vez, serán sustrato de los organismos metanogénicos (Lawrence & McCarty, 1969). Asimismo, los ácidos grasos de cadena larga también serán degradados a través de la β -oxidación, para producir hidrógeno molecular y dióxido de carbono (Souza *et al.*, 2009).

Es una etapa compleja desde el punto de vista de las reacciones bioquímicas, los intermediarios y la diversidad de organismos involucrados. La producción de VFAs dentro del reactor disminuye levemente el pH, lo cual resulta beneficioso para las bacterias acidogénicas y acetogénicas (pH óptimo 4,5-5,5). Por otro lado, la acumulación de VFAs debe estar controlada y el pH debe mantenerse en un rango estricto en el entorno de la neutralidad, ya que esta es una causa común de inhibición del proceso e inestabilidad del reactor.

Nuevamente, las bacterias que participan en la acidogénesis son un grupo muy diverso filogenéticamente. Los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Propionibacterium* son fermentadores de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga son comúnmente encontrados en estos sistemas (Chrissy *et al.*, 2014).

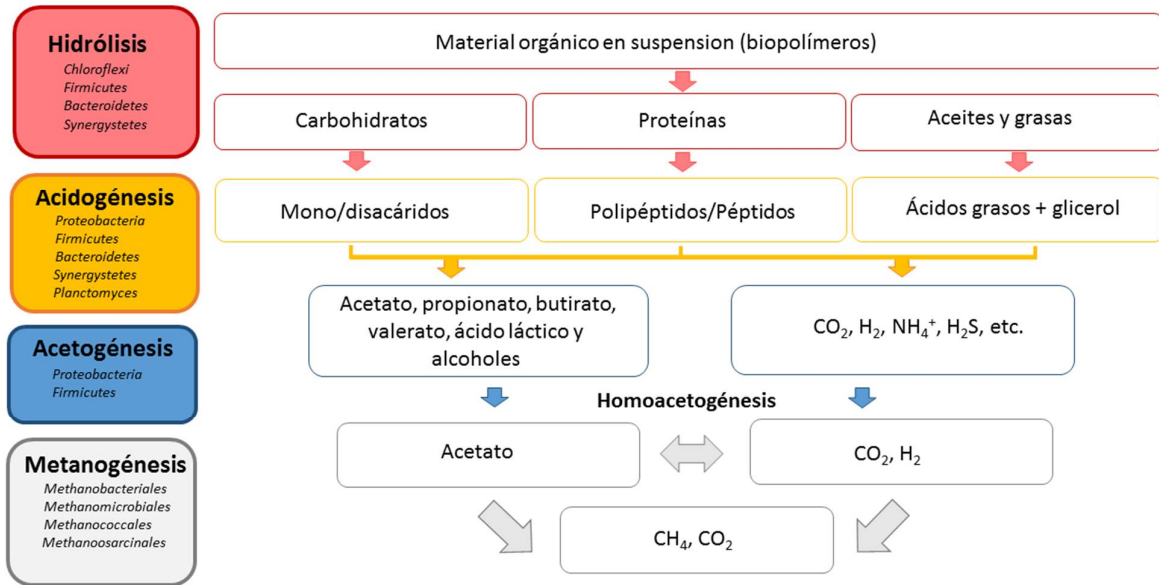


Figura 1. 2. Esquema de las cuatro etapas de la digestión anaerobia mostrando los principales grupos de bacterias y arqueas.

1.3.3 Acetogénesis

Las bacterias «acetogénicas», oxidan los VFAs con más de tres carbono (butirato, valerato y propionato, etc.) así como los ácidos grasos de cadena larga a acetato, hidrógeno molecular y dióxido de carbono. Estas reacciones no son termodinámicamente favorables y se dan gracias a la simbiosis de las bacterias acetogénicas con arqueas metanogénicas acetoclásticas o en su defecto con bacterias reductoras de sulfato (Schink, 1997). Las bacterias acetogénicas presentes en sistemas anaerobios son un grupo muy diverso desde el punto de vista filogenético pero que comparten las características de ser organismos anaerobios estrictos con un pH óptimo cercano a 6, tener un crecimiento lento y producir acetato como producto final. Además, son bastante sensibles a las fluctuaciones en la carga orgánica, necesitando largos períodos para adaptarse a nuevas condiciones ambientales. Dos especies muy conocidas son *Syntrophomonas wolfeii* y *Syntrophobacter wolinii* (Drake et al., 2002).

Las bacterias acetogénicas tienen un papel clave en la mineralización de la materia orgánica, etapa en la cual compiten con fermentadores primarios y secundarios por la degradación de compuestos monoméricos o productos de fermentación como ácidos orgánicos, etanol e hidrógeno.

El uso del término “acetogénico” no ha sido consistente en la literatura y ha causado cierta confusión con el término “acetógeno”. Es importante entonces establecer la diferencia entre estos dos términos. Estrictamente las bacterias acetógenas fueron definidas como aquellos anaerobios que emplean la vía del acetil-CoA como i) mecanismo para la reducción del acetil-CoA empleando CO_2 , como ii) aceptor final de electrones del metabolismo energético y como iii) mecanismo para la asimilación de CO_2 (Drake, 1994). En esta definición el acetato como producto final no es relevante, ya que la misma se basa más en la utilización de la vía del acetil-CoA que en su destino. Esta definición en cambio, contiene a todos las bacterias acetogénicas, por ejemplo, *Eubacterium limosum*, *Butyribacterium methylotrophicum* y *Caloramator pfennigii* (anteriormente *Clostridium pfennigii*) que producen ácido butírico por la vía del acetil-CoA.

Por otro lado, el término “acetogénico” originalmente fue pensado como un adjetivo para referir a todos los organismos que producen acetato sin importar la vía que emplean y que hasta el momento pueden ser tres: i) la vía del acetil-CoA, ii) la vía dependiente de glicina sintasa y iii) la vía reductiva del ácido cítrico. Por esto fue necesario crear el término “homoacetogénico”, que se refiere únicamente a aquellos acetogénicos que emplean la vía del acetil-CoA para producir acetato a partir de H_2 y CO_2 (Drake, 2006).

El acetato por su parte, es un intermediario clave en ambientes anóxicos debido a que es el producto principal tanto de los acidogénicos como de los acetogénicos y sirve además de fuente de carbono y energía a las arqueas metanogénicas (Ferry, 2015). Además, se encuentra íntimamente conectado con la concentración de dióxido de carbono a través de las reacciones de homoacetogéneis y la oxidación sintrófica de acetato (SAO), que se describirán más adelante.

A partir del trabajo pionero de Jeris & McCarty en 1965, se ha adoptado como paradigma en la digestión anaerobia de residuos que el 60% de la materia orgánica se transforma en acetato y entonces la vía acetoclástica es la principal vía de producción de metano. Aunque, esta idea es cada vez más cuestionada por un creciente número de trabajos que demuestran que la metanogénesis a partir de H_2 y CO_2 puede ser la principal vía de formación de metano en sistemas anaerobios diseñados, como es el caso de los reactores (Zinder, 1994, Karakashev *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2009).

Este cambio en la vía principal de producción de metano sucedería en condiciones inhibitorias de la metanogénesis acetoclástica. Y esta sería una situación frecuente en el área del tratamiento de residuos, por ejemplo, cuando se trata un efluente rico en proteínas que genera altas concentraciones de amonio. En dichas condiciones la metanogénesis comenzaría a través de la oxidación de acetato sintrófica (SAO) y de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas (Westerholm *et al.*, 2011, Müller *et al.*, 2013, Sun *et al.*, 2014).

La SAO implica dos reacciones enzimáticas, la primera es la oxidación del acetato a H_2 y CO_2 por las bacterias sintróficas oxidadoras de acetato (SAOB) y la segunda consiste en la reducción del CO_2 a CH_4 por arqueas hidrogenotróficas. La mayoría de las SAOB conocidas hasta el momento han sido identificadas como acetógenas, es decir que emplean la vía del acetyl-CoA para asimilar CO_2 , por ejemplo, *Thermacetogenium phaeum*, *Clostridium ultunense*, *Syntrophaceticus schinkii* y *Tepidanaerobacter acetatoxydans*.

En este modelo de trama trófica, la homoacetogénesis y la SAO son dos reacciones que funcionarían como un atajo que interconecta las dos posibles vías de formación de metano, a saber, la vía acetoclástica y la hidrogenotrófica. Este mecanismo aseguraría la producción de metano redirigiendo la vía principal de síntesis, en respuesta a condiciones ambientales cambiantes (Figura 1,3).

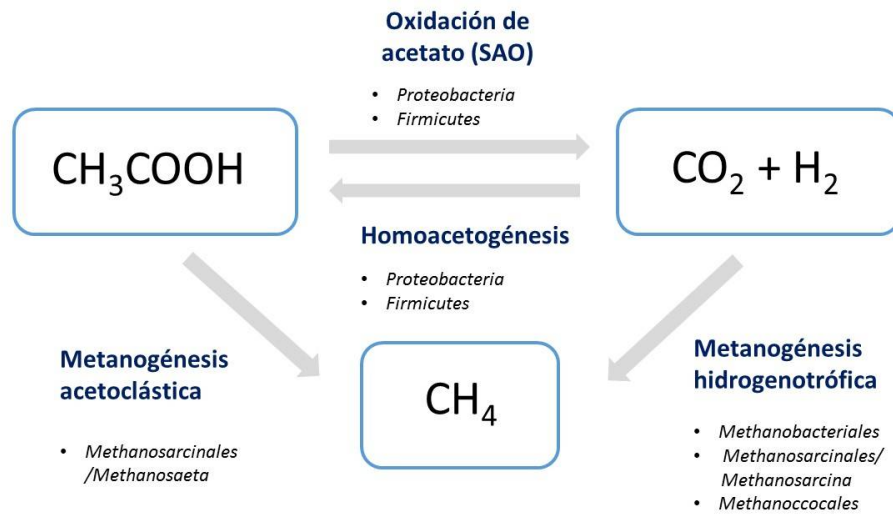


Figura 1. 3. Esquema que muestra las dos posibles vías de formación de metano, metanogénesis acetoclástica o hidrogenotrófica

1.3.4 Metanogénesis

El metano se produce exclusivamente por un grupo de «arqueas metanogénicas», como producto residual de su metabolismo. Estas pertenecen al filo *Euryarchaeota* y poseen la capacidad de emplear hidrógeno molecular, dióxido de carbono, formato, compuestos metilados de un carbono o acetato, como fuentes de energía y carbono para su crecimiento celular. En comparación con las bacterias hidrolíticas y acidogénicas, este grupo de arqueas metaboliza sólo un conjunto reducido de sustratos. La contraparte de este estilo de vida especialista, es la capacidad de obtener energía para el mantenimiento celular y el crecimiento, en los límites termodinámicos de la vida. En estos organismos el ATP no se genera a través de la fosforilación a nivel de sustrato sino a través de una fosforilación dada por una fuerza ión motriz, es decir, un gradiente de iones (generalmente Na^+ o H^+) (Schlegel & Müller, 2013).

Las arqueas metanogénicas fueron clasificadas en cinco órdenes taxonómicos; *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*,

Methanococcales y *Methanopyrales*. La diversidad de arqueas metanogénicas presentes en los reactores anaerobios se considera actualmente compuesta por cuatro de estos órdenes (*Methanobacteriales* (MBT), *Methanomicrobiales* (MMB), *Methanococcales* (MCC) y *Methanosarcinales* (MSL), el cual se subdivide en dos familias (*Methanosarcinaceae* (Msc), *Methanosaetaceae* (Mst)) (García *et al.*, 2000, In *et al.*, 2001).

A su vez, también pueden ser clasificadas respecto a la vía metabólica que emplean para la producción de metano (Figura 1.4). Pueden describirse dos vías metabólicas de producción de metano: en la primera se da el clivaje de la molécula de acetato para producir metano y dióxido de carbono (*metanogénesis acetoclástica*). Y en la segunda, el metano se produce por la reducción de la molécula de dióxido de carbono con hidrógeno (*metanogénesis hidrogenotrófica*). Muchos metanogénicos hidrogenotróficos también tienen la capacidad de metabolizar formato además de hidrógeno, como dador de electrones.

La gran mayoría de los metanogénicos son hidrogenotróficos. En la metanogénesis hidrogenotrófica, el dióxido de carbono es reducido secuencialmente por coenzimas especiales (metanofurano (MTF), tetrahidrometanopteina (H₄MPT) y coenzima M (CoM) para formar los intermediarios formil, metilen y metilo. La enzima clave en esta vía es la metil coenzima-M reductasa, codificada por el gen *mcrA* y la cual reduce la metil coenzima M a metano. Una vez oxidada la coenzima-M forma un complejo heterodisulfuro con la coenzima B (CoB). Este intermediario heterodisulfuro CoM-S-S-CoB es de vital importancia en la vía, debido a que su reducción está acoplada a la conservación de energía, siendo el aceptor final de la cadena respiratoria de los metanogénicos (Thauer *et al.*, 2008. Hedderich & Whitman, 2013).

La metanogénesis hidrogenotrófica se representa por la siguiente ecuación:



En condiciones estándar, se produce un cambio de energía libre (ΔG^0) de -131 kJ.mol^{-1} , el cual es suficiente para la síntesis de aproximadamente 2 moles de ATP. Sin embargo, a las bajas concentraciones de H_2 que se encuentra en la naturaleza, este cambio de energía se reduce a un tercio de ATP por mol de metano producido en condiciones estándar (Thauer *et al.*, 2008).

La metanogénesis acetoclástica se representa por la siguiente ecuación:



Esta reacción posee el ΔG^0 menor de todas las reacciones metanogénicas (-36 kJ.mol^{-1}). En la metanogénesis acetoclástica, el acetato es convertido directamente a metano. El grupo carboxilo del acetato se oxida a dióxido de carbono mientras que el grupo metilo se reduce a metano. La degradación de acetato ocurre por dos vías principales, que difieren únicamente en un paso. Uno de los grupos de metanogénicos acetotróficos, de la familia de los *Methanosarcinaceae*, usan el sistema acetato quinasa fosfotransacetilasa para activar la molécula de acetato a acetil coenzima A. Luego, el segundo grupo de la familia *Methanosaetaceae*, convierten adenosina monofosfato (AMP) formando acetil coenzima A sintetasa (Smith & Ingram-Smith, 2007).

Un nivel más de clasificación que atraviesa a los anteriores, es la presencia de citocromos, proteínas ancladas a la membrana que participan en el metabolismo bioenergético de la célula. La gran mayoría de organismos metanogénicos son hidrogenotróficos, no poseen citocromos y únicamente emplean gradientes de Na^+ para la síntesis de ATP. Asimismo, otros grupos evolutivamente más avanzados, como los miembros del género *Methanosarcina*, tienen sitios adicionales de acoplamiento de energía (citocromos), donde se traslocan H^+ siendo también permeables a iones Na^+ . La ventaja evolutiva de poseer un sistema adicional para mantener el gradiente de membrana, impacta en el rendimiento en términos de gramos de biomasa por mol de metano. Los metanogénicos hidrogenotróficos con citocromos presentan mayor rendimiento en el crecimiento y mayores concentraciones de H_2 que aquellos sin citocromos, es decir, los hidrogenotróficos (Thauer *et al.*, 2008).

Por otro lado, el tiempo de duplicación máximo de los hidrogenotróficos ha sido estimado en 6 horas, mientras que sus compañeras acetoclásticas crecen en tiempos de 2,6 días. Asimismo, los hidrogenotróficos son más resistentes a los cambios ambientales como concentraciones altas de amonio y altas temperaturas (Batstone *et al.*, 2002). Estas observaciones plantean la interrogante acerca de cuáles serían los microorganismos que utilizarían el acetato proveniente de la degradación de materia orgánica, si en realidad los metanogénicos acetoclásticos se encuentran en muy baja abundancia. En este escenario, las bacterias oxidadoras de acetato (SAOB) serían el grupo candidato para la degradación de acetato a H₂/CO₂. Aunque este proceso es termodinámicamente desfavorable ($\Delta G^0 = 104,6 \text{ KJmol}^{-1}$), se tornaría posible gracias a la simbiosis de las SAOB con los metanogénicos hidrogenotróficos (Nettman, *et al.*, 2010).

La vía principal de generación de metano en los distintos reactores anaerobios a escala real es un tema reciente y aún se está lejos de conocer qué vías dominan en qué diseño de reactor y en cuál tipo de efluente tratado. Recientemente se han realizado estudios moleculares y filogenéticos que indicarían que los metanogénicos hidrogenotróficos serían los más abundantes pero la incorporación de esta información a una explicación robusta que se base en cálculos energéticos es un área incipiente

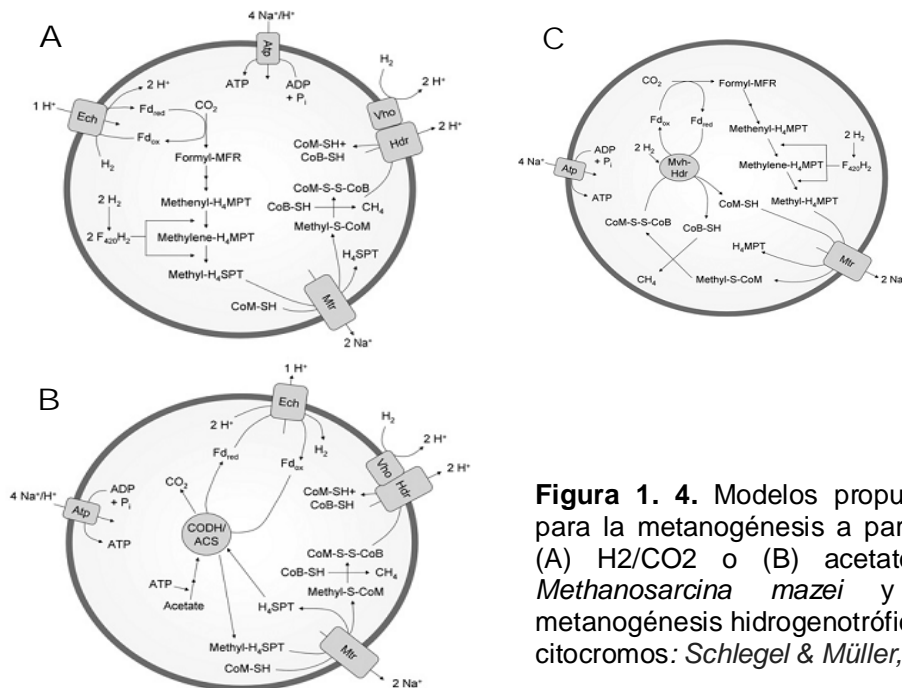


Figura 1. 4. Modelos propuestos para la metanogénesis a partir de (A) H₂/CO₂ o (B) acetato en *Methanosarcina mazei* y (C) metanogénesis hidrogenotrófica sin citocromos: Schlegel & Müller, 2013

1.4 Técnicas de biología molecular aplicadas al estudio de las comunidades anaerobias

El uso de los métodos independientes de cultivo revolucionó nuestra idea de la diversidad microbiana, revelando una gran diversidad presente en ambientes tan disímiles como suelos, lagos subglaciales antárticos o desiertos (Baker & Dick, 2013). En el área de la digestión anaerobia estas técnicas han permitido identificar grupos claves que llevan a cabo reacciones específicas pero que no han sido posibles de cultivar aún.

Si nuestro conocimiento se encontrase restringido a los organismos cultivables, el entendimiento de la fisiología y la ecología microbiana asociadas sería bastante parcial y sesgado, debido a que los organismos aislados muchas veces no reflejan su rol en el ambiente y además los factores ambientales que moldean las estructuras de dichas comunidades, tampoco estarían reflejados. Recientemente se han publicado un par de trabajos que resumen la gran cantidad de herramientas moleculares disponibles en la actualidad, para estudiar específicamente las comunidades anaerobias de los reactores (Vanwonterghem *et al.*, 2014, Cabezas *et al.*, 2015).

Durante la última década, mediante el desarrollo de métodos independientes de cultivo junto con los métodos de análisis de imágenes, el trazado isotópico y el análisis químico, ha permitido conocer la composición y función de las comunidades y los organismos dominantes, especialmente de aquellos que participan en el paso final de la metanogénesis. Los trabajos más destacados han empleado una combinación de estas herramientas para conocer los sistemas anaerobios (Ito *et al.*, 2012).

Estas técnicas también permitieron el avance en lo que hasta ahora conocemos respecto al efecto que ejerce el tipo de alimentación, la configuración del reactor y las condiciones de operación sobre la estructura y dinámica de las comunidades. De esta forma se ha encontrado que la mayoría de los reactores anaerobios se encontraban dominados por especies previamente no caracterizadas.

Las preguntas clásicas de las que parte la Ecología Microbiana son: ¿Quiénes están allí? ¿Y quién está haciendo qué?

1.4.1 Secuenciación del gen *rARN de 16S*

Para responder la primera pregunta y analizar las distintas estructuras que presentan las comunidades microbianas en los distintos reactores actualmente se emplean métodos genómicos (Figura 1.5). El gen *rARN de 16S* ha sido y es el más estudiado y el que presenta la mayor base de datos. Durante la década de los 90 y comienzos del 2000 las técnicas tradicionales de *fingerprinting* como DGGE (o TGGE), SSCP y T-RFLP junto con las librerías de clones y la secuenciación de Sanger eran las herramientas disponibles del momento y con las cuales se comenzó a descubrir la diversidad de microorganismos presentes en los reactores. Estas técnicas consumían un tiempo considerable de trabajo en laboratorio (*time-consuming*) y la información que se obtenía era relativamente escasa (*low-throughput*) en comparación con las técnicas de secuenciación que disponemos actualmente (Delmont *et al.*, 2012)

El reciente impacto de las técnicas de secuenciación masiva (454, ion Torrent, MySeq Illumina) revolucionó esta área de estudio, haciendo posible obtener miles de secuencias a costos bajos, en períodos de tiempo también cortos. Esto a su vez, permitió procesar varias muestras al mismo tiempo y así obtener información espacial y temporal, generando un volumen de información con gran poder estadístico para realizar análisis de correlaciones. Concomitantemente se han desarrollado herramientas bioinformáticas y estadísticas específicas para analizar este tipo de datos, lo que ha generado un nuevo nivel de análisis de los mismos.

Actualmente es posible conocer las comunidades microbianas presentes en los reactores con un gran poder de resolución (Werner *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2012). Además, empleando análisis de correlaciones se ha demostrado que algunas variables de operación como la temperatura o el tipo de efluente ejercen

una fuerte selección que moldea la estructura de la comunidad, inclusive hasta para hacer cambiar la principal vía metanogénica (Sundberg *et al.*, 2013, Ziganshina, *et al.*, 2013).

1.4.2 Metagenómica

La segunda pregunta atañe al campo de investigación más desafiante en la actualidad. Determinar el potencial funcional y las vías metabólicas activas en el tiempo, y en los distintos sistemas, es el próximo escalón a subir en el conocimiento de la Ecología Microbiana. Hasta el momento las herramientas para abordar esta área de estudio se encuentran en el campo de la 'ómica' o aún más allá, la 'meta' - 'ómica'. La palabra 'ómica' se emplea como sufijo e intenta transmitir el concepto de estudio holístico, en el sentido de analizar o estudiar toda la información contenida en los sistemas. Así entonces podemos referirnos a la metagenómica, cuando se estudia el ADN, metaproteómica en el caso de las proteínas y más recientemente, la metatranscriptómica, cuando se analiza en profundidad el mRNA, en este caso de un microbioma.

La metagenómica es la secuenciación masiva al azar de fragmentos de ADN extraídos directamente de una comunidad microbiana que habita un ambiente. Este abordaje va más allá del gen *rARN de 16S* y permite conocer la potencialidad de funciones metabólicas presentes en el ambiente estudiado a través del estudio de la frecuencia de los genes (funcionales) presentes. Se ha empleado para describir las funciones presentes en una variedad de ambientes y en aquellos con baja diversidad, se ha logrado ensamblar genomas completos de organismos no cultivables. De hecho, la reconstrucción de genomas es el objetivo principal de esta disciplina. Aunque, en la mayoría de los casos dicha tarea se ve impedida debido a la necesidad de poder de cálculo para poder ensamblar genomas partiendo de millones de fragmentos pequeños.

De todos modos, se está trabajando intensamente en mejorar estos aspectos y se especula que durante la próxima década la metagenómica sirva para reconstruir miles de genomas a partir de ambientes diversos. El análisis de

genomas individuales permitirá conocer con exactitud las funciones que llevan adelante las distintas poblaciones así como saber cuáles son redundantes. Los clostridios y su versatilidad de funciones un ejemplo claro de cómo impactaría este nuevo conocimiento a nivel de genomas. Por el momento muchas de las funciones codificadas en los genomas de este grupo aún no se conocen debido a que no es posible predecirlas empleando únicamente el gen *rARN de 16S* y a que las técnicas de aislamiento no abarcan una gran cantidad de metabolismos (Vanwonterghem *et al.*, 2014).

En el área de la digestión anaerobia la metagenómica ha comenzado a emplearse recientemente. En uno de los primeros trabajos realizado en una planta de biogás (Jaenicke *et al.*, 2011) se confirmó que los *Firmicutes* y los *Bacteroidetes* son los responsables de la degradación de los polisacáridos y su fermentación. Los autores además sugieren que a los *Clostridios* se encontraban en una asociación sintrófica con los metanogénicos hidrogenotróficos. Más recientemente, Yang *et al.* (2014) encontró que la metanogénesis acetoclástica sería la vía principal de formación de metano cuando analizó muestras de dos biodigestores de lodos, así como Delforno *et al.* (2017) cuando analizó muestras de un reactor que trató efluente de un establecimiento avícola.

1.4.3 Metatranscriptómica

La metatranscriptómica es el área más nueva de investigación en la Ecología Microbiana e implica el análisis de los ARN mensajeros (mARN) que fueron previamente transcritos reversamente a ADN copia (cADN). Esta estrategia permite medir *in situ* la expresión de los distintos genes, reduciendo el nivel de complejidad de los metagenomas y focalizándose únicamente en las secuencias de los miembros activos de la comunidad. Los genes se deben mapear contrastando los *reads* con algún genoma o metagenoma de referencia para poder calcular sus niveles de expresión. Aunque por el momento la técnica enfrenta grandes desafíos metodológicos a superar como la recuperación de mARN de buena calidad en muestras ambientales, el corto tiempo de vida media del mARN y las dificultades para enriquecer los extractos en mARN, que en

procariotas se enmascara por la gran cantidad de rARN así como el sesgo introducido por la síntesis y amplificación de cADN (Vanwonterghem *et al.*, 2014).

La metatranscriptómica aún es muy limitada en el área de la digestión anaerobia, en 2012 se realizó el primer proyecto de este tipo empleando una comunidad anaerobia (Zakrzewski *et al.*, 2012). En el trabajo los autores demostraron la expresión de transcritos de enzimas responsables de la hidrólisis del sustrato, acidogénesis y formación de acetato. También encontraron una actividad transcripcional alta por parte de las arqueas. Sin embargo, una gran parte de los *reads* no pudieron ser asignados, lo que resalta la necesidad de lograr un metagenoma y/o genomas de referencia. El segundo trabajo fue publicado por Xia *et al.* (2014) y describe los microorganismos involucrados en la digestión anaerobia de celulosa en condiciones termofílicas. Los autores lograron asignar 40.000 genes activos y remarcan que las arqueas más dominantes en número (hidrogenotróficas), no serían las más activas desde el punto de vista de la expresión de sus genes. En base a esta observación, los autores cuestionan la idea de que las arqueas acetoclásticas se inhiban metabólicamente en condiciones termofílicas, siendo en realidad inhibidas en término de número de células.

1.4. 4 Metaproteómica y metabolómica

Otras dos estrategias meta-ómicas que emplean el producto final de la expresión génica y generan cantidades masivas de información, han sido empleadas para estudiar comunidades de reactores anaerobios. Por un lado la metaproteómica analiza todas las proteínas que se extraen de un microbioma y por otro lado la metabolómica estudia todos las biomoléculas pequeñas o metabolitos, definidos como cualquier molécula de menos de 1 kDa de tamaño. En base a resultados de metaproteómica, se ha construido un modelo metabólico para la degradación de un efluente sintético a base de glucosa (Abram *et al.*, 2010).

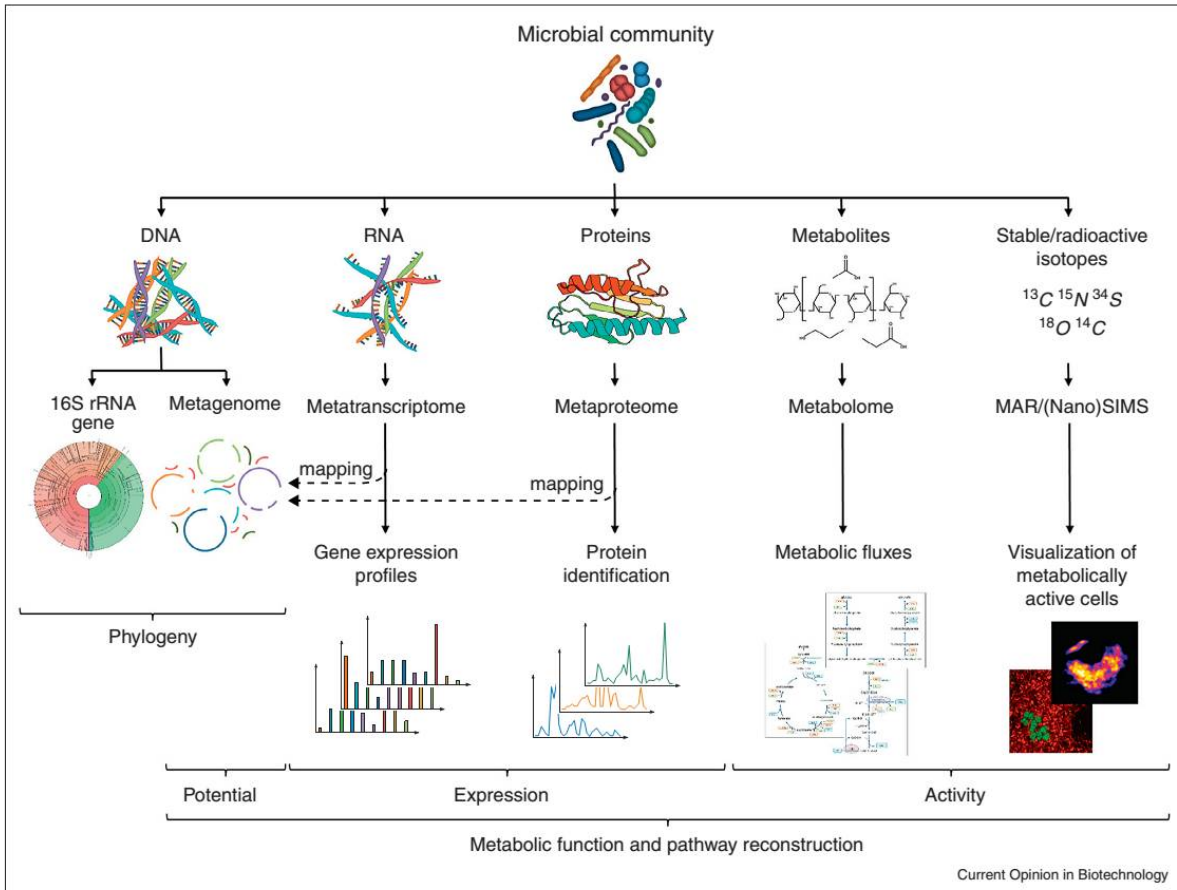


Figura 1. 5. Resumen de las técnicas disponibles y su alcance para responder interrogantes dentro del campo de la Ecología microbiana. *Adaptado de: Vanwonterghem et al., 2014.*

1.4.5 Técnicas de marcado isotópico

Sin embargo, además de conocer la estructura y funciones a través de técnicas moleculares es importante tener en mente la importancia de aislar nuevos organismos para luego conocer su fisiología en profundidad. De hecho, el aislamiento de microorganismos debe ser complementario al abordaje metaómico. Así, la 'ómica' provee de pistas para desarrollar métodos de cultivo de organismos aún no cultivables y en contrapartida los genomas de estos organismos irán volviendo más robustas a las técnicas de predicción empleadas en la omica (Narihiro & Kamagata, 2013).

Otra gran área de estudio está centrada en monitorear poblaciones específicas *in situ*, ya sea mediante las tasas de consumo de sustrato o visualizando la organización espacial de la comunidad. Actualmente se dispone de una batería de técnicas disponibles como la Microradioautografía (MAR), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y el marcado con isótopos estables (SIP) que ha sido extensamente empleada en lodos anaerobios. La técnica de SIP permite identificar microorganismos activos que asimilan sustratos de carbono u otros nutrientes marcados a su biomasa, lo cual permite medir funciones metabólicas directamente en las comunidades presentes en el ambiente (Dunford & Neufeld, 2010).

1.4.6 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Finalmente, una de las grandes interrogantes en la microbiología de los reactores anaerobios es la cuantificación de las poblaciones de interés. En este tipo de sistemas manipulados es muy importante tener alguna herramienta que permita saber cuántos microorganismos hay presentes en los lodos para poder comparar distintos sistemas o evaluar la performance del reactor. En la Tabla 1.1 se resumen algunos de los trabajos más relevantes que estudiaron las poblaciones de arqueas metanogénicas en sistemas a escala real, empleando distintos sustratos.

La herramienta más empleada ha sido el FISH. En esta técnica se utiliza una sonda de ADN fluorescente, complementaria a un tramo de la secuencia del ARN ribosomal de la población de interés, la sonda se hibrida con los ribosomas de las células blanco en preparados de muestras ambientales y luego se realizan recuentos de células fluorescentes al microscopio. Raskin *et al.* (1994) diseñó un juego de ocho sondas para distintos grupos de arqueas metanogénicas que luego se emplearon en una gran cantidad de estudios empleando la técnica de FISH. En 2006, Crocetti *et al.*, actualizaron la lista de sondas. Por otra parte Sekiguchi *et al.* (1999) empleó la técnica para estudiar la estructura de los gránulos, mientras que Chen *et al.* (2009) utilizó la técnica para contar organismos metanogénicos en un reactor que trató efluente con fenol.

La técnica de FISH presenta algunas limitaciones que deben ser tenidas en cuenta, por ejemplo, la baja permeabilidad celular, especialmente de la células Gram+, el límite de detección que se encuentra entre 10^3 y 10^4 células.mL⁻¹, células con un bajo número de ribosomas (aquellas con tiempos de duplicación largos) o en estado de dormancia y autofluorescencia de la misma muestra (en arqueas es un fenómeno común) (Cabezastabla *et al.*, 2015). Este método es además muy demandante en horas de trabajo de laboratorio (*time-consuming*), pero su principal ventaja es que es posible cuantificar y al mismo tiempo determinar la posición de las células dentro de la comunidad. Sekiguchi *et al.*, (1999) demostró por primera vez la distribución espacial de los microorganismos en dos tipos de lodos metanogénicos granulares (mesófilico y termofílico). En ambos tipos de gránulos se demostró una organización de capas, donde las bacterias se ubicaron en aquellas más superficiales y las arqueas metanogénicas en las más profundas.

1.4.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Más recientemente se ha incorporado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o qPCR para estimar la cantidad de microorganismos en muestras ambientales. Esta técnica cuantifica por fluorescencia moléculas de ADN en solución. La principal diferencia con la técnica de PCR convencional (a tiempo final) es que los productos son detectados en cada ciclo durante la fase exponencial del proceso (Higuchi *et al.*, 1992).

La cuantificación absoluta del número de copias de un gen de interés generalmente se realiza por uno de los dos métodos siguientes: i) adición de un intercalante fluorescente (SYBR Green I), el cual emite fluorescencia cuando se une al ADN (Wittwer *et al.*, 1997) o ii) sondas de oligonucleótidos fluorescentes (TaqMan) (Heid *et al.*, 1996)(Figura 1.6). La tecnología Taqman (Gudnason *et al.*, 2007) es bastante más específica que el SYBR Green I, debido a que es una tercera región (luego de los primers) de complementariedad de bases que se

emplea, lo que reduce drásticamente los falsos positivos.

Aunque en algunos casos el SYBR Green I resulta la mejor opción, por ejemplo cuando la secuencia del gen blanco dificulta el diseño sondas específicas como es el caso de la cuantificación de algunos genes del dominio Bacteria.

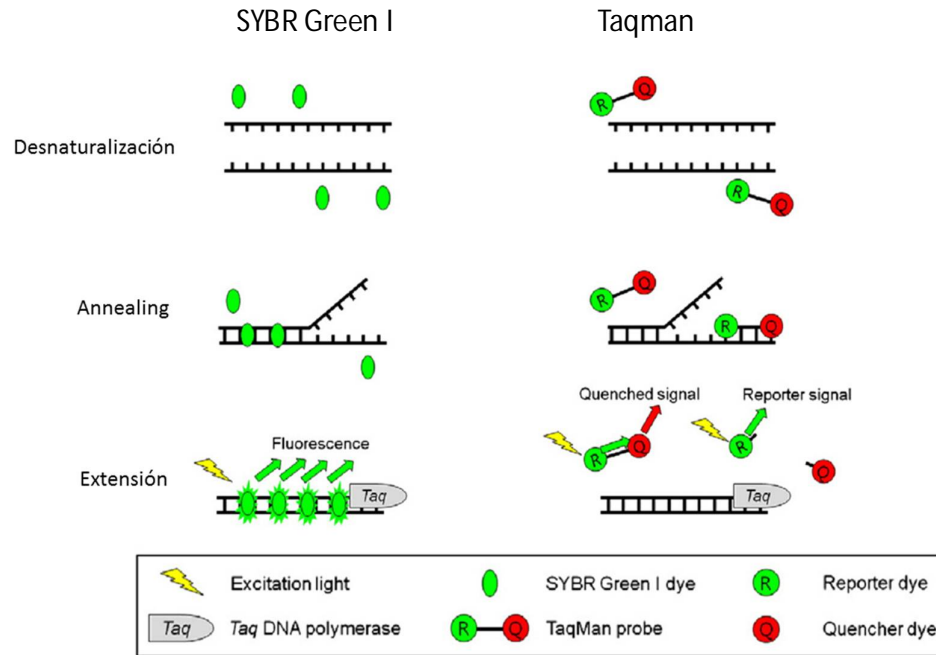


Figura 1. 6. Química de detección en la qPCR: (izq.) Técnica de SYBR Green I, (der.) sonda Taqman. Adaptado de: Kim *et al.*, 2013.

Desde los trabajos pioneros a principios del 2000, esta técnica se ha ido incorporando cada vez más en los estudios de microbiología ambiental y ha servido para estudiar genes ribosomales y funcionales a través de coordenadas de espacio y tiempo. En el área de la digestión anaerobia destaca el trabajo de Kim *et al.*, (2013) que describe el estado del arte en la cuantificación de los diferentes grupos de microorganismos encontrados en sistemas de tratamiento de efluentes.

En lo que respecta al seguimiento de los metanogénicos, generalmente

se emplean dos genes; el de *rARN de 16S* (Yu *et al.*, 2005) y el gen *mcrA* (Alvarado *et al.*, 2014). El gen *mcrA* codifica para la enzima metil coenzima-M reductasa. Empleando sondas Taqman para distintos grupos de arqueas metanogénicas, varios estudios comenzaron a acumular evidencia del cambio de vía metabólica, de acetoclástica a hidrogenotrófica cuando las comunidades anaerobias son sometidas condiciones estresantes como altas concentraciones de amonio o altas temperaturas. Esto fue demostrado para reactores a escala de laboratorio y en muestras de lodos de reactores a escala real (Lee *et al.*, 2009, McKeown *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2010, Town *et al.*, 2014).

Tabla 1.1. Estudio de las vías metanogénicas en sistemas anaerobios a escala real y su correlación con parámetros de operación o condiciones ambientales ambientales

Reactor /Digestor	Sustrato	Escala	Metanogénicos dominantes	Correlación con	Técnica	Referencia	Año
Digestor	Lodo activado	Real	Acet	n.d.	Sonda P ³²	Raskin <i>et al.</i>	1994
Digestor	Residuos municipales	Lab	Hidrog	n.d.	Sonda P ³²	Raskin <i>et al.</i>	1994
13 diestores/reactores	Residuos municipales, efluentes ind. Textil, pílpa celulosa, matadero, lixiviado	Real	Hidrog/Acet	NH ₄ , sales, VFAs	acetato y bicarbonato 14	Shnürer <i>et al.</i>	1999
15 digestores	Estiércol	Real	Hidrog	NH ₄ , VFAs	FISH	Karakashev <i>et al.</i>	2005
15 digestores	Lodos activados	Real	Acet	NH ₄ , VFAs	FISH	Karakashev <i>et al.</i>	2005
Digestor	Lodos activados	Real	Acet	HRT	qPCR	Yu <i>et al.</i>	2005
Reactor UASB	Efluente ind. Porcina	Piloto	Hidrog	NH ₄	qPCR	Song <i>et al.</i>	2009
Digestores	Glucosa, permeado suero, sweage líquido	Batch	Hidrog	Tipo sustrato, OLR	qPCR	Lee <i>et al.</i>	2009
6 digestores	Estiércol líquido	Real	Hidrog (5 de 6)	n.d.	qPCR, FISH, AR-DRA	Nettman <i>et al.</i>	2010
Batch	Acetato 14	Batch	Hidrog	NH ₄ /T	FISH/ acetato 14	Fotidis <i>et al.</i>	2012
Reactor	Sintético/ amonio	Batch	Hidrog	NH ₄	qPCR	Westerholm <i>et al.</i>	2012
Reactores IFB/EGSB	Efluente lácteo	Lab	Hidrog	T	qPCR	Bialek <i>et al.</i>	2012
Digestor	Residuos ind. Alimentos	Real	Hidrog	NH ₄	qPCR	Williams <i>et al.</i>	2013
6 digestores	lodos activados	Real	Hidrog	n.d.	qPCR/ DGGE	Kim <i>et al.</i>	2013
13 digestores	Lodos activados, estiércol, frigorífico	Real	Hidrog	NH ₄ , VFAs, T	qPCR/ acetato 14	Sun <i>et al.</i>	2014
Reactor	Efluente alimentos	Lab	Hidrog	OLR	qPCR	Jang <i>et al.</i>	2014
Reactor SBR	Celulosa/glucosa	Lab	Hidrog	T	metagenómica	Xia <i>et al.</i>	2014
Digestor	Co-digestión residuos agrícolas	Real	Hidrog	n.d.	metagenómica	Jaenicke <i>et al.</i>	2010
Reactor UASB	Efluente matadero aves	Real	Acet	n.d.	16S amplicon and WGS sequencing	Delforno <i>et al.</i>	2017
2 digestores	Cloacales	Real	Acet	n.d.	Metagenómica	Yang <i>et al.</i>	2014
21 reactores/digestores	Codigestión, lodos activados	Real	Hidrog (CD)/ acetocl(SS)	Tipo de sustrato, T	secuenciación masiva	Sundberg <i>et al.</i>	2013
Digestor	Co-digestión estiércol, material vegetal	Piloto	Hidrog/Acet	n.d.	TRFLP y librería de clones, mcrA 16S	Ziganshina <i>et al.</i>	2013
9 reactores U	Ind. Cerveza	Real	nd	n.d.	secuenciación masiva	Werner <i>et al.</i>	2011

1.5 Tipos de reactores

La Digestión Anaerobia se ha desarrollado fundamentalmente en las últimas cuatro décadas y ha llegado a constituirse hoy en una tecnología fundamental en sistemas de tratamiento de residuos orgánicos (Lettinga, 2001, van Lier, 2015). 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 de reactores del tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) o de manta de lodos de alta tasa de última generación como los EGSB (*Expanded Granular Sludge Bed*), IC (*Internal Circulation*), entre otros (Figura 1.7).

Los reactores UASB se caracterizan por una baja huella de carbono y una alta carga volumétrica aplicable. Además presentan otras ventajas como la simplicidad de la tecnología, el bajo requerimiento de espacio y baja producción de lodo (van Lier, 2008). En efluentes con alta concentración de materia orgánica la importante producción de biogás, posibilita la depuración del mismo y la valorización energética del residuo.

Las mejores performances se obtienen cuando la manta de lodos consiste en un lodo granular con una alta actividad y buenas propiedades de sedimentación. La granulación provee al lodo de una rica diversidad de microorganismos, una alta concentración de biomasa, buenas características de sedimentación, un tiempo de retención de sólidos alto, reduce el costo y el volumen del reactor y también una alta tolerancia a inhibidores y cambios en la temperatura (van Lier, 2015). Sin embargo, la granulación de los lodos no puede garantizarse en todos los tipos de efluentes. Especialmente durante las últimas dos décadas, varias configuraciones de reactores de alta tasa han demostrado no ser dependientes de la granulación y muchos de ellos han sido aplicados exitosamente en el tratamiento de varios tipos de efluentes en distintas partes del mundo (van Lier, 2015).

1.5.1 Configuraciones de reactores anaerobios

Actualmente existen varias configuraciones de reactores que pueden ser consultadas en Mc Carty, 2001 y van Lier, 2015. Como se mencionó en la reseña histórica fueron Imhoff (1916) y Buswell (1932) quienes comenzaron a desarrollar sistemas para el tratamiento de efluentes. Desde la década de 1920 y hasta la del 1960, los reactores completamente agitados o CSTR fueron la tecnología empleada, la principal desventaja de estos reactores de alta carga es que precisan de grandes volúmenes.

A partir de esto los reactores de alta tasa generalmente refieren a los sistemas en los cuales el tiempo de retención de sólidos se encuentra desacoplado del tiempo de retención hidráulico. Los reactores de alta tasa a su vez, pueden ser clasificados por la forma en que se produce este desacoplamiento, la inmovilización del lodo ya sea a través de gránulos o biofilms es la forma tradicional de alcanzar la retención de biomasa necesaria (Lettinga *et al.*, 1980; Rittmann & McCarty, 2001).

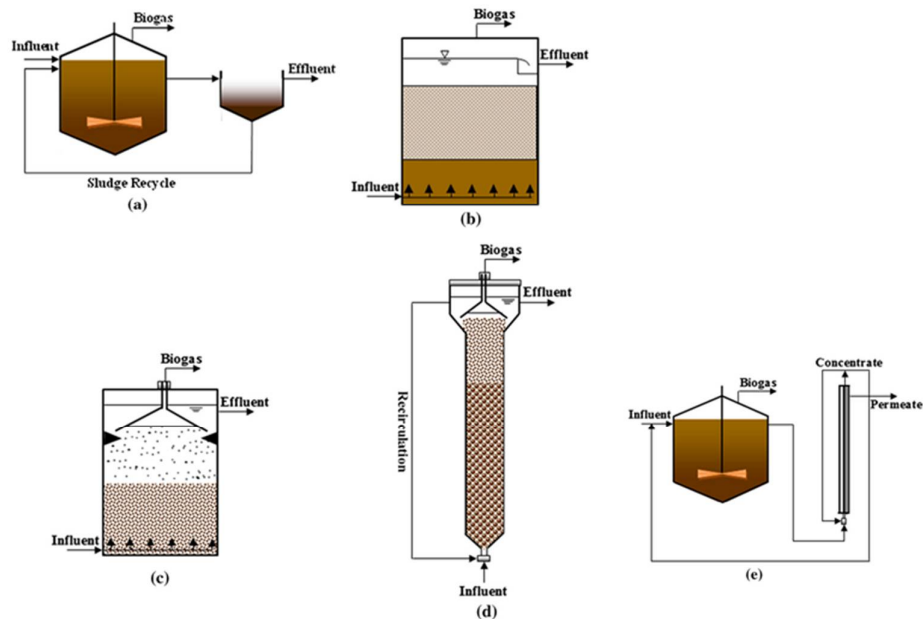


Figura 1. 7. Ejemplos de reactores de alta tasa (a) ACP, (b) AF, (c) UASB, (d) EGSB y (e) de membrana acoplada CSTR o AnMBR

Así podemos describir distintas configuraciones, a saber, los de proceso de contacto anaerobio (ACP), los filtros anaerobios (AF), los de manta de lodos de flujo ascendente (UASB), los reactores de lecho fluidizado (FB), los de lecho expandido (EGSB), los reactores de circulación interna (IC), los reactores anaerobios con deflectores (ABR), los de alta tasa de membrana acoplada (UASB/EGSB/FB) y los sistemas de membrana acoplada (CSTR). Este último se conoce con el nombre de bioreactor de membrana (AnMBR) (van Lier, 2015). En la figura 1.7 se muestran varios diseños de este tipo de reactores. Al presente, los reactores de manta de lodos de alta tasa como los UASB, EGSB e IC son los más utilizados

1.5.2 Reactores de flujo ascendente UASB

Uno de los desarrollos más notables dentro de los reactores de alta tasa fue la invención del reactor de flujo ascendente UASB (*upflow anaerobic sludge bed*) por Lettinga (1976, 1980). La retención de la biomasa en el reactor se da a través de agregados, ya sean flóculos o gránulos, con buenas propiedades de sedimentación y en la aplicación de un dispositivo interno de separación gas-líquido-sólido en forma de embudo reverso (campana o GLSS). El esquema del diseño se muestra en la figura 1.7 (c).

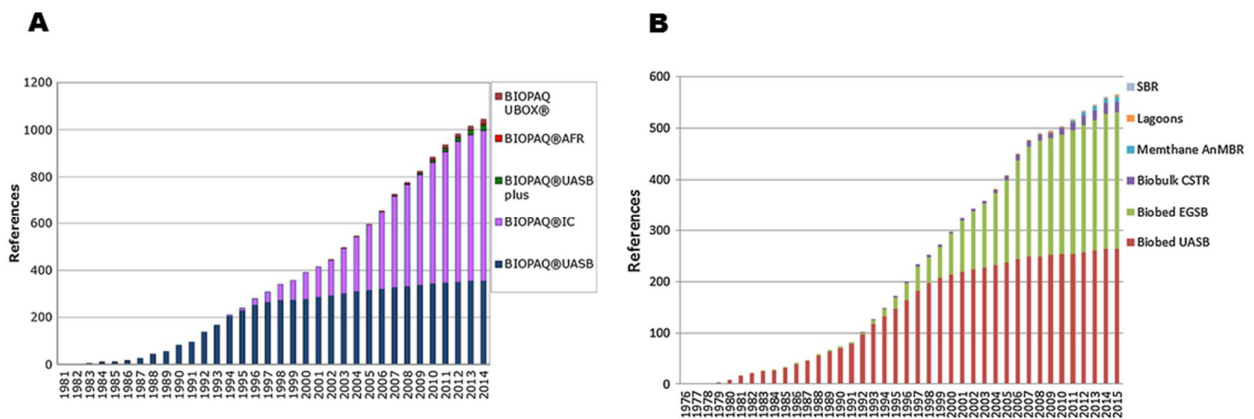


Figura 1. 8. Evolución de las ventas de reactores industriales de tratamiento anaerobio de aguas residuales de las dos mayores empresas internacionales, (A) Paques y (B) Biothane-Veolia. *Adaptado de:* van Lier, 2015.

Los reactores UASB son por lejos los más populares dentro del campo de tratamiento anaerobio de efluentes. El 90% de los reactores de alta tasa instalados en el mundo entre 2002 y 2007 fueron de manta de lodos, siendo el diseño IC y EGSB los más demandados en los últimos años (van Lier, 2015). En la figura 1.8 se muestra la evolución de los reactores anaerobios vendidos por las dos mayores empresas internacionales.

Los primeros reactores a escala real fueron instalados para el tratamiento de efluentes de la industria de bebidas, alimentos y agrícola. Rápidamente su uso se extendió a efluentes de la industria de papel y de molinos (Habets & Knelissen, 1997). En la actualidad también se está comenzando a implementar este tratamiento en efluentes de la industria química (Rajagopal *et al.*, 2013).

De forma similar a los filtros anaerobios el efluente se mueve en un flujo ascendente a través de la manta de lodos del reactor. Aunque con la ventaja de que en el reactor UASB no hay material empaquetado. La buena capacidad de sedimentación, los bajos tiempos de retención hidráulica, la eliminación del material de empaquetado, las altas concentraciones de biomasa (hasta 80 g.l^{-1}), la separación efectiva de sólido/líquido y la operación a altas cargas volumétricas ($4\text{-}15 \text{ kg DQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$) son las características alcanzadas por este tipo de reactores (Speece, 1996). No obstante, las limitaciones de esta tecnología se evidencian con efluentes con altos contenidos de sólidos suspendidos, que impedirían la formación de lodo granular (Alphenaar, 1994).

El concepto de reactor de manta de lodos se basa en algunos conceptos generales:

- El lodo anaerobio posee o adquiere una buena capacidad de sedimentación, siempre que sea operado correctamente. Las partículas pequeñas o con mala sedimentación serán lavadas del reactor.
- El contacto entre el efluente y el lodo se logra a través de que la alimentación se distribuye lo más uniformemente posible sobre el fondo del reactor. Asimismo, la velocidad ascensional resulta en un buen “contacto” entre las partículas de lodo y el sustrato. A cargas volumétricas

de 5 kgDQO. $m^{-3}.d^{-1}$, la mezcla de lodo y efluente se da por las turbulencias que produce el biogás generado.

- En el caso de efluentes que contienen inhibidores biodegradables, la hidrodinámica de la mezcla se alcanza aplicando adicionalmente un flujo de recirculación. Como resultado se evita la estratificación.
- El “lavado” de los agregados de lodo con actividad se evita instalando un separador trifásico gas-sólido-líquido (GSL), en la parte superior del reactor.
- El dispositivo GSL constituye una parte esencial del reactor y cumple las siguientes funciones; separa y descarga el biogás producido, reduce las turbulencias del líquido en el sedimentador, retiene partículas de lodo por sedimentación, limita la expansión del lodo hacia el sedimentador, evita que las partículas de lodo que llegan a la parte superior, se laven del reactor.

1.6 Indicadores y predicciones a partir de las comunidades microbianas

Si bien la digestión anaerobia de residuos es una tecnología consolidada, los microorganismos claves de la anaerobiosis así como sus funciones y asociaciones aún no se conocen de forma cabal. Algunas de las limitaciones para avanzar en el conocimiento actualmente son, la complejidad del microbioma anaerobio y el gran número de organismos no caracterizados presentes en dichos sistemas, así como la alta especialización de funcionamiento debida a restricciones termodinámicas, las limitaciones de los métodos basados en ADN y la entrada continua de microorganismos con las alimentaciones en sistemas que por definición son abiertos (Carballa *et al.*, 2015).

Actualmente, uno de los grandes desafíos es determinar “indicadores microbianos”, basados en la estructura de la comunidad y asociados a condiciones de funcionamiento óptimas de los reactores. A diferencia de los “indicadores de funcionamiento” como los VFAs, el índice de Ripley o las

concentraciones de hidrógeno, aún no se han desarrollado indicadores microbianos robustos (Carballa *et al.*, 2015).

El *Microbial Resource Management* fue una de las primeras iniciativas en este sentido (Verstraete *et al.*, 2007, Mazzoratti *et al.*, 2008). En esta misma búsqueda, Carballa *et al.*, (2015) ha planteado un modelo que explica la dinámica y estructura de la comunidad microbiana pero basado en tres grandes mecanismos; resistencia, resiliencia y redundancia funcional (Allison *et al.*, 2008) y que se muestra en la figura 1.9. Por definición, las poblaciones resistentes son capaces de sobrellevar cambios en el ambiente sin variaciones en su composición, las poblaciones resilientes están regidas por un efecto rebote luego de una perturbación y las poblaciones redundantes directamente son reemplazadas por otra población cuya función es redundante con la original, sin afectar entonces el funcionamiento de la comunidad.

Aplicando estos conceptos se podría construir un microbioma *core* que quedaría definido por todos los organismos resistentes, el problema es que aún se conoce poco sobre ellos y por el momento solo es posible emplearlos como huella digital o *fingerprint* de ciertos tipos de reactores.

Por otro lado, las bacterias hidrolíticas y fermentativas serían un ejemplo de las poblaciones redundantes, mientras que las sintróficas tenderían a ser más resilientes. Las bacterias sintróficas de hecho tienden a ser miembros minoritarios dentro de las comunidades pero de extrema importancia debido a su alta especialización. Por este motivo su supervivencia luego de una perturbación es crucial para preservar o recuperar todo el sistema.

Por último, las arqueas serían los miembros menos diversos y con menor resiliencia en comparación con las bacterias. Como consecuencia, la metanogénesis sería más susceptible al estrés y la inestabilidad. Los autores (Carballa *et al.*, 2015) especulan al respecto que los *Methanobacteriales* serían la población resistente, las *Methanosaeta* la población redundante y las *Methanosarcina* y las *Methanomicrobiales* las poblaciones resilientes.

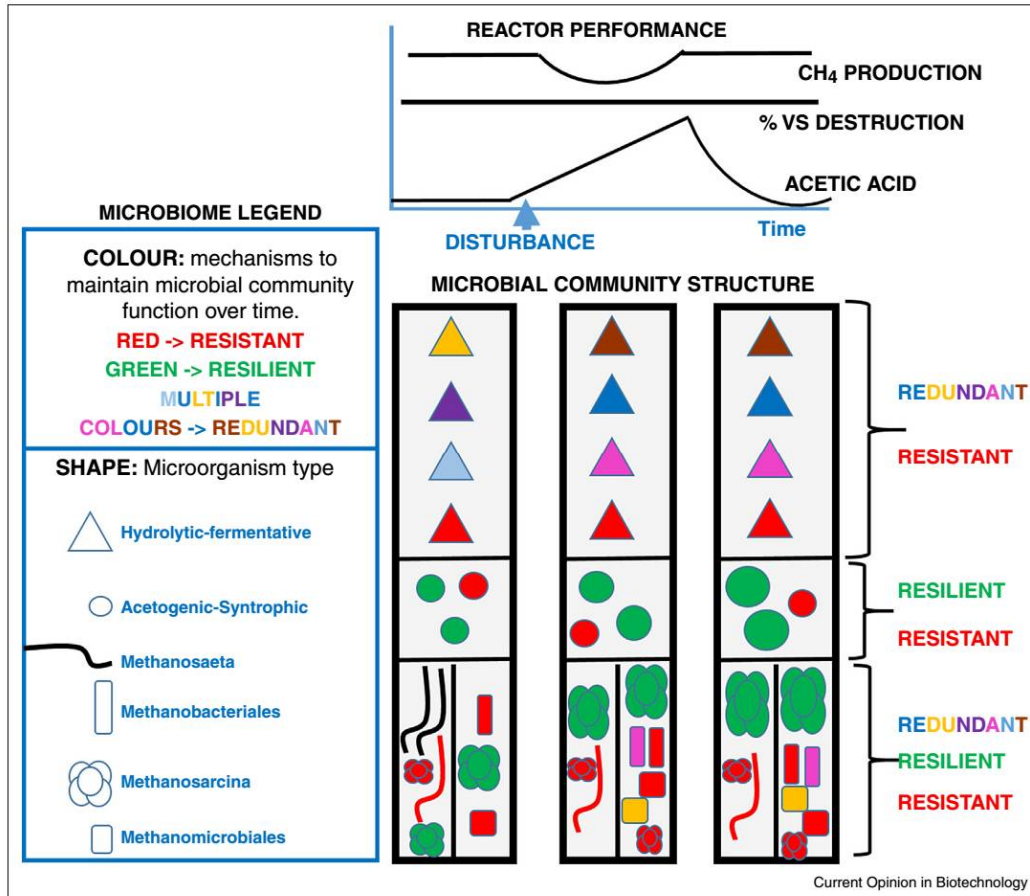


Figura 1. 9. Respuesta del microbioma a una perturbación. Fuente: Carballa *et al.*, 2015.

Este modelo además plantea entre otros, el desarrollo de indicadores microbianos de buen funcionamiento y de advertencia o alarma en los reactores (Figura 1.10). Basados en la filogenia, es decir, la presencia o variación de un determinado organismo, los investigadores han desarrollado algunos indicadores. Por ejemplo, miembros de la clase *Clostridia* cumplen con la función de degradación de proteínas y celulosa, mientras que miembros de la clase *Bacilli* son responsables de la descomposición de grasas y carbohidratos.

Los filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Firmicutes* han sido destacados por varios autores en reactores de sólidos. Y de hecho la capacidad de estas bacterias fermentativas de metabolizar una gran variedad de sustratos explicaría

esta hipótesis. Por otro lado, la presencia de *Syntrophomonas* (degradadoras de propionato y butirato) y de *Synergistetes* (oxidadores de acetato sintróficos) darían cuenta de una buena actividad acetogénica y acetotrófica, respectivamente. Dentro de los metanogénicos, el orden *Methanosarcinales* y en menor medida el orden *Methanomicrobiales* serían dominantes en reactores estables, siendo el género *Methanosaeta* el degradador principal de acetato (acetoclástico) (Carballa *et al.*, 2015).

La falta de estudios que analicen la respuesta de las bacterias a las perturbaciones, la redundancia funcional y su resiliencia ha impedido la identificación de indicadores bacterianos de advertencia o alarma (Carballa *et al.*, 2015).

Indicator type		Monitoring		Warning	
		Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea
Phylogenetic		X	Stable active archaeal population	X	<i>Methanosaeta</i> and/or active archaeal population decrease
Numerical	Diversity	High	X	X	X
	Evenness	Intermediate	X	Decrease	X
	Dynamics	X	X	X	X

Figura 1. 10. Los indicadores microbianos propuestos se dividen en filogenéticos (superior) y numéricos (inferior). A su vez estos indicadores se elaboraron para el monitoreo de los reactores (izquierda) y para estados denominados de alarma (derecha). *Fuente:* Carballa *et al.*, 2015.

Como puede observarse en la figura 1.10, dentro de los indicadores numéricos aún no hay indicadores para monitorear o detectar situaciones de alerta empleando la dinámica de las poblaciones bacterianas. La equitatividad, entendida como la distribución de la estructura de la comunidad microbiana, es una herramienta que podría aplicarse con este objetivo. La equitatividad (*evenness*) daría cuenta del funcionamiento del reactor y su eventual desestabilización, si esta disminuye. Por último, dentro de los indicadores

numéricos se plantea que una alta diversidad de especies sería esperable en un reactor funcionando adecuadamente. No obstante, el valor de estos indicadores no se informa sino que se presentan como categorías, lo cual en conclusión, dificulta su aplicación ¿Qué rango de valores de equitatividad definen la categoría “intermedia”? Lejos de ser una regla de oro, estos indicadores han resultado muy valiosos para comparar muestras entre sí dentro de un mismo set de datos.

Dentro de los marcadores filogenéticos aún no ha sido posible desarrollar indicadores para las bacterias debido a los factores mencionados anteriormente por lo que los autores proponen emplear las arqueas como indicadores de estabilidad y advertencia. Una disminución de las arqueas activas en el sistema indicaría una señal de alerta, mientras que su estabilidad en el tiempo reflejaría la estabilidad del sistema. Sin embargo, poder identificar algún indicador dentro de las bacterias sería valioso debido a que se podrían detectar más tempranamente situaciones desestabilizantes del reactor. El desarrollo de indicadores bacterianos sería un paso más hacia el desarrollo de herramientas predictivas del sistema.

Finalmente, en el área de los reactores a escala real se han logrado aplicar estas tecnologías para identificar los principales grupos de microorganismos (Rivière *et al.*, 2009, Werner *et al.*, 2011, Sundberg *et al.*, 2013, de Vrieze *et al.*, 2016). Estos estudios fueron ambiciosos y analizaron una gran cantidad de reactores, incluyendo una gran variedad de sustratos sólidos y líquidos, así como configuraciones de reactores (de mezcla completa, EGSB y UASB, entre otros) y de condiciones de operación (carga orgánica aplicada, temperatura, pHs, etc.).

Dichos trabajos fueron muy valiosos debido a que fueron los pioneros en utilizar una gran cantidad de información genética para comparar distintos sistemas reales y sentaron una línea de base de la diversidad de bacterias y arqueas presentes en los distintos reactores. Aunque, debido a la gran cantidad de variables mencionadas que incluyó cada uno de estos estudios, no se lograron establecer correlaciones claras entre los distintos grupos microbianos y

los parámetros de operación. Además, las conclusiones de dichos trabajos no coinciden en cuáles serían los factores ambientales u operacionales que determinarían las comunidades microbianas a esta escala. De hecho, este es el nuevo desafío para los investigadores del área de la microbiología de reactores y en general, de la microbiología ambiental (Widder *et al.*, 2016). Establecer dichas correlaciones permitirá mejorar los modelos existentes y predecir el comportamiento frente a las distintas condiciones de operación o situaciones desestabilizantes.

1.7 Problemas detectados en reactores UASB

1.7.1 Granulación

La granulación es uno de los puntos más importantes en la operación de los reactores UASB. Es necesario que se formen gránulos de tamaño adecuado y que éstos se mantengan en el reactor. Gránulos de tamaño muy grande pueden acarrear problemas de transferencia de masa y gránulos muy pequeños problemas de mala sedimentación. Muchos factores pueden afectar la granulación, por ejemplo: las propiedades fisicoquímicas de los constituyentes del lodo, como la hidrofobicidad de la superficie de las células, la presencia de polímeros extracelulares y la composición de la flora microbiana (Tiwari *et al.*, 2006).

Los reactores de gran escala (escala industrial) en general se inoculan con biomasa granular por parte de las empresas que los comercializan (Paqués, Biothane-Veolia). En Uruguay muchas veces es difícil acceder a volúmenes tan grandes de biomasa granular como para inocular estos reactores, a lo cual se suma además el problema del transporte de ese volumen de biomasa si tiene que traerse de la región o incluso desde Europa.

Una alternativa local que ha solucionado estas dificultades ha sido el de inocular los reactores con sedimentos de lagunas anaerobias de la zona donde se encuentra la industria (Passeggi *et al.*, 2009, López *et al.*, 2007). El proceso

de granulación ocurre en el propio reactor durante el comienzo de la operación (período de arranque del reactor).

1.7.2 Problemas de sedimentación

En general los reactores anaerobios no presentan problemas de sedimentación o *bulking* y esa es una gran ventaja de estos reactores sobre los reactores aerobios. Aunque en condiciones subóptimas de alimentación puede producirse un sobrecrecimiento de organismos del filo *Chloroflexi* que desestructuran los gránulos y producen el fenómeno de *bulking* (Sekiguchi *et al.*, 1999, Borzacconi *et al.*, 2008).

1.7.3 Problemas de inhibición

Otro tipo de problemas frecuentemente reportados en procesos anaerobios es la inhibición por algún compuesto químico. Una gran variedad de sustancias pueden ser inhibitorias de la degradación anaerobia. Dentro de las más comúnmente reportadas se encuentra la inhibición por amonio, sulfuro, metales pesados, iones metálicos, así como algunos compuestos orgánicos. Se han realizado considerables esfuerzos en tratar de detectar los mecanismos de inhibición y los factores que la controlan. Pero, debido a las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas en estos estudios, los resultados sobre el efecto de los inhibidores varían mucho en la literatura. En general, las soluciones que se han encontrado para este tipo de problemas son la utilización de inóculos adaptados al inhibidor, o la adaptación de la biomasa incrementando la concentración de inhibidor secuencialmente, o la incorporación de métodos que eliminen estos inhibidores (Chen *et al.*, 2009).

La sobrecarga de reactores anaeróbicos muchas veces produce acumulación de ácidos orgánicos dentro del reactor, lo cual produce un descenso del pH causando una inhibición de la metanogénesis (Shcmidell *et al.*, 2007). Por lo tanto, uno de los parámetros que permite monitorear este proceso es la concentración de ácidos dentro del reactor. En este sentido se definió el índice de Ripley que relaciona la concentración de ácidos grasos libres con la capacidad buffer del reactor (Ripley *et al.*, 1986). Estos autores sugieren que se

deben operar los reactores en valores de índice de Ripley menores de 0,3 para evitar problemas de acidificación.

1.8 Problemas de hidrólisis en efluentes lácteos

Los efluentes de la industria láctea, así como otros efluentes de agroindustrias características de nuestro país (frigoríficos cárnicos, lavaderos de lana) generan efluentes con alto contenido en grasa. Este tipo de efluentes es difícil de tratar anaerobiamente. Su composición depende del proceso involucrado. En esta tesis el efluente proviene del lavado de tanques y cañerías y podría aproximarse a la leche pasteurizada diluída. Así, los principales componentes serían grasas, proteínas (principalmente caseína) y azúcares, principalmente glucosa y en menor medida lactosa y galactosa. En las tablas AI.III y AI.IV (Anexo I) se presentan los valores de estos componentes en la leche y en algunos efluentes lácteos.

Los problemas más comúnmente reportados cuando se aplica la tecnología anaerobia a este tipo de efluente, son debidos a la adsorción de la grasa por el lodo y la baja velocidad de lipólisis y β - oxidación. La adsorción de la grasa por los lodos produce además de problemas de transferencia de masa, la dificultad de producir gránulos acarreado problemas de flotación de los lodos y lavado de la biomasa. Por otra parte se han reportado problemas debido a la baja velocidad de hidrólisis de las grasas y de fermentación de los ácidos grasos de cadena larga. Estos problemas causan inhibición de la metanogénesis por acumulación de ácidos en el reactor (Sayed 1984; Sayed 1987; Rinzema 1993; Hwu *et al.* 1998).

Vidal *et al.* (2000) reportaron que la biodegradabilidad del agua residual de lechería con alto contenido en grasas se ve limitada por la velocidad de hidrólisis. Sin embargo, estos autores observaron que utilizando una biomasa adaptada y cargas moderadas la velocidad de hidrólisis no limita más el proceso, la etapa limitante pasa a ser entonces la degradación de los ácidos grasos de cadena larga. Esta degradación se ve disminuida por problemas de adsorción a la biomasa (Pereira *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2004) y problemas de inhibición

de la metanogénesis por la acumulación de ácidos (Perle *et al.*, 1995, Hwu *et al.*, 1996).

Para solucionar estos problemas se ha recurrido al pretratamiento del efluente separando la grasa mecánicamente y a la adaptación de los lodos. Se ha reportado que utilizando alimentación intermitente se logra adaptar la biomasa y superar los problemas asociados a la baja velocidad de la degradación de grasas, mejorando significativamente la eficiencia del proceso (Sayed 1984; Nadais *et al.*, 2006). Cavaleiro *et al.* (2008) utilizaron un reactor de alimentación en pulsos aumentando sensiblemente la tolerancia a la concentración de ácidos grasos de cadena larga.

Basados en estos trabajos, investigadores de nuestro grupo (Passeggi *et al.*, 2009) diseñaron un sistema de dos reactores UASB modificados con un separador interno de grasa y un recuperador de lodos externo (sedimentador). El sistema se completa con un digestor del material flotado para estabilizar este material. Para lograr la adaptación de los lodos al alto porcentaje de grasa del efluente (40%) se realizó el arranque del reactor utilizando una estrategia de alimentación intermitente. Con este diseño y estrategia de arranque se logró la operación exitosa del reactor que trata el efluente de la industria ininterrumpidamente desde su arranque.

1.9 Problemas asociados al tratamiento de la vinaza

La vinaza es un residuo producido a partir de la destilación del bioetanol, altamente concentrado. En este efluente la composición también depende de la materia prima empleada así como de los procesos de extracción, fermentación y destilación del azúcar. Si bien su composición es variable, en general tiene una muy alta concentración de potasio, lo cual sería un factor potencialmente inhibidor en el tratamiento anaerobio de este residuo. En la tabla AI.VII (Anexo I) se muestran los valores de los principales componentes de algunas vinazas, incluyendo la vinaza de caña de azúcar.

En el trabajo de Driessen *et al.* (1994) los autores sugirieron que los efectos inhibitorios quizás se deban a las altas concentraciones de sales, sulfuros y ácidos volátiles y la presencia de compuestos caramelizados. Asimismo, Harada *et al.* (1996) sugirió que la presencia de compuestos fenólicos también podría ser una causa de toxicidad en los reactores.

En este tipo de efluente se emplean reactores operados en continuo, en donde el arranque consiste en el incremento progresivo de la carga orgánica, lográndose la aclimatación de la biomasa. En el modo continuo, la historia de la biomasa es un elemento clave para obtener una performance exitosa del reactor.

1.10 Limitaciones e interrogantes abiertas en el conocimiento

La literatura presentada en este capítulo pretende mostrar la acumulación de conocimiento en torno a la tecnología de la digestión anaerobia, haciendo énfasis en la microbiología del proceso. Si bien es una tecnología consolidada que se ha desarrollado a nivel de industria y actualmente se conocen mayormente las reacciones involucradas, así como los grupos de microorganismos que llevan a cabo el proceso, aún prevalecen grandes interrogantes en cada área de estudio. En cierta medida el avance de la tecnología en el presente estaría limitado por las repuestas a dichas interrogantes.

Un aspecto clave es la dificultad para establecer el vínculo entre la estructura y dinámica de la comunidad microbiana con los parámetros del proceso. A través del entendimiento de la respuesta microbiana y de los disparadores de dicha respuesta al estrés ambiental, podremos evitar fallas en el proceso e inclusive diseñar estrategias para optimizar el mismo. En este sentido, la Omica y su estudio holístico de la expresión de genes, metabolitos y genomas ha tendido un puente para alcanzar este objetivo.

Aunque hay una vasta cantidad de información acerca de la diversidad de microorganismos presentes en distintos sistemas anaerobios, algunos asuntos fundamentales aún son poco comprendidos o poco caracterizados. Por ejemplo,

la hidrólisis de varios sustratos en aguas cloacales a bajas temperaturas o la hidrólisis de las grasas en efluentes lácteos aún están lejos de llegar a resultados conclusivos. La determinación de la vía metabólica de producción de metano predominante en las distintas condiciones y con distintos sustratos, es otro ejemplo de áreas del conocimiento que aún precisan ser iluminadas.

El grupo de Biotecnología para Procesos del Ambiente (BIOPROA) del Dpto. de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería, UDELAR, ha venido desarrollando líneas de investigación en tratamiento de residuos desde el año 1986, llevando a cabo la transferencia tecnológica al sector productivo y al sector estatal (Passegi *et al.*, 2009, López & Borzacconi, 2011, Passegi *et al.*, 2012). Dentro de estas experiencias podemos mencionar el diseño y la puesta en operación de plantas de tratamiento de distintos tipos de residuos, por ejemplo: cloacales (OSE, Pando, Canelones), efluentes industriales (Maltería Oriental, S.A. La paz, Canelones; CONAPROLE, San Ramón, Canelones; COLEME, Melo, Cerro Largo; ALUR, Bella Unión, Artigas) y rellenos sanitarios (IMM, Las Rosas, Maldonado), entre otros.

Asimismo, desde hace más de 10 años se comenzó a trabajar en colaboración con la Dra. Claudia Etchebehere, quien lidera el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE, MEC) y con quien se han desarrollado varios proyectos en conjunto. Como fruto de la interacción de dichos grupos de investigación se han publicado manuscritos en diversas revistas científicas (Castelló *et al.*, 2009; Cabezas *et al.*, 2009; Borzacconi *et al.*, 2008; Gutiérrez, *et al.*, 2007; Benítez *et al.*, 2006; Cabezas *et al.*, 2006) y me he formado específicamente realizando esta tesis de doctorado. Esta línea de estrecha colaboración interdisciplinaria entre la microbiología y la ingeniería de reactores constituye un camino imprescindible para profundizar en determinados fenómenos y procesos y posibilitar un desarrollo más fundamentado de la tecnología.

En este contexto se planteó este trabajo de tesis, que pretende aportar información de sistemas anaerobios a escala industrial y que además tratan con dos tipos de efluentes, lácteo y vinaza, que han sido considerados difíciles de

tratar con esta tecnología. La información generada pretende aportar conocimiento acerca de las estructuras de las comunidades microbianas en reactores de industrias nacionales y particularmente estudiar la dinámica de dichos consorcios en el período de arranque y adaptación al efluente. La información acerca de este estado transitorio es bastante escasa en sistemas de escala real.

1.11 Alcance de la tesis y objetivos

Se estudiaron tres reactores a escala industrial, uno para el tratamiento de efluentes de una industria de producción de etanol a partir de caña de azúcar (ALUR) y dos de la industria láctea. Los tres reactores fueron diseñados, instalados y operados por el grupo de BIOPROA (Biotecnología de Procesos para el Ambiente), del Departamento de Ingeniería de Reactores de la Facultad de Ingeniería

Dos de los reactores, a saber, uno de efluente lácteo y el otro de vinaza, fueron monitoreados desde su arranque y operación mediante tres abordajes: i) análisis fisicoquímicos (composición de gas, sólidos suspendidos volátiles, ácidos volátiles) ii) actividades metanogénicas específicas y iii) moleculares (secuenciación del gen *rARN de 16S* y qPCR). Se emplearon los resultados obtenidos a partir de cada uno de estos tres abordajes, junto con los datos de operación de los reactores, de manera de poder explicar su funcionamiento. Estos resultados ayudarán a solucionar posibles problemas de operación así como buscar estrategias que minimicen estos problemas.

Problemas que se abordaron

-Arranque de reactores a escala industrial de alta carga

Los reactores se inocularon con biomasa de lagunas anaerobias de la región donde se encuentra la industria. Durante el período de arranque se estudió la granulación de la biomasa y la adaptación del inóculo a las nuevas condiciones de trabajo.

- Alimentación intermitente en reactores de industria láctea

El arranque del reactor de tratamiento de la industria láctea fue en forma intermitente (3 días de alimentación y 3 días de no alimentación), para estimular el crecimiento de los microorganismos degradadores de las grasas. Esta estrategia ya ha sido aplicada con éxito en otros reactores, sin embargo no se había estudiado el efecto de este tipo de operación, no convencional, sobre la comunidad microbiana. Se realizaron además ensayos de actividad de degradación de sustrato graso específica (ADSGE) para poder detectar problemas de hidrólisis de las grasas.

-Operación zafral en el reactor de ALUR

Debido a que la producción de caña de azúcar es zafral y por lo tanto también la producción de etanol a partir de caña, el efluente (vinaza) se produce en grandes volúmenes únicamente durante el período de producción. En general, los reactores de vinaza de caña operan durante los meses de producción, mientras que permanecen sin alimentación en los períodos interzafrales. Esta modalidad de operación zafral de los reactores, trae aparejada una serie de problemas a resolver. Por ejemplo, las condiciones de mantenimiento de la biomasa durante el período de la interzafra para que el reactor no pierda actividad. Además, en el caso del reactor estudiado, fue necesario buscar la mejor estrategia para el re-arranque del mismo, en un segundo año de operación. Se monitoreó entonces este reactor metanogénico durante la zafra y en el período interzafra para determinar cómo se afecta la comunidad microbiana y cómo esta se pudo readaptar a un nuevo período de operación.

-Problemas de inhibición

En ambos reactores pudieron ocurrir problemas de inhibición por cambios bruscos de pH, alta concentraciones de sales (como es esperable en la vinaza), etc. Estos problemas se detectaron en el reactor que trató efluente lácteo a raíz de una descarga accidental de soda al reactor durante una parada de mantenimiento de la planta. Se estudió el efecto sobre la comunidad microbiana, intentando determinar las causas de la inhibición y las condiciones en las que se revirtió la inhibición.

-Estado transitorio de reactores metanogénicos

Antes de alcanzar la estabilidad del sistema, durante la fase de arranque, el reactor se encuentra en un estado transitorio en el cual la biomasa se adapta a las nuevas condiciones de operación y al tipo de efluente al que es expuesto. La estabilidad así como la evolución del estado transitorio del proceso generalmente se monitorea midiendo parámetros químicos como la concentración de ácidos grasos volátiles, el porcentaje de metano en el biogás, la eficiencia de remoción de la materia orgánica, etc. Pero en general no se monitorean los cambios en la comunidad microbiana. En este trabajo de Tesis se realizó el estudio de las comunidades microbianas durante el período de arranque o transitorio de operación. En base a los datos de composición de las comunidades microbianas se buscó entender la performance de los reactores. Estos conocimientos serán útiles para diseñar estrategias adecuadas de diseño, operación y arranque de reactores metanogénicos.

1.12 Hipótesis y objetivos

1.12.1 Hipótesis

En reactores metanogénicos industriales a escala real, las comunidades microbianas se adaptan a las condiciones de operación impuestas.

Durante la fase de arranque se producen cambios en la estructura de las comunidades microbianas con respecto a la comunidad presente en el inóculo.

En reactores con efluentes industriales complejos la metanogénesis hidrogenotrófica es dominante.

1.12.2 Objetivos generales

Conocer la estructura y dinámica de las comunidades microbianas en reactores UASB metanogénicos de tratamiento de efluentes de industrias nacionales durante su fase de arranque.

Evaluar cómo responde cada grupo de microorganismos a las condiciones de operación de manera de entender su función en la comunidad.

Conocer la vía principal de producción de metano en reactores UASB metanogénicos a escala real que tratan efluentes complejos.

1.12.3 Objetivos específicos

- Conocer los principales cambios en la estructura de las comunidades microbianas en reactores a escala real durante su fase de arranque
- Determinar el aumento o la disminución en la diversidad durante la fase de arranque
- Analizar cómo responden las comunidades microbianas frente a perturbaciones que ocurren accidentalmente durante la operación
- Determinar los cambios en la estructura de las comunidades en respuesta a períodos de parada de la operación del reactor
- Conocer las vías metabólicas principales de producción de metano en reactores a escala real de tratamiento de efluente lácteo
- Determinar si existen diferencias en la estructura de las comunidades de arqueas metanogénicas en un reactor en fase de arranque y otro en fase de operación estable de tratamiento de efluente lácteo

- Conocer la estructura de la comunidad de arqueas metanogénicas en un reactor a escala real de tratamiento de vinasa de caña de azúcar

1.12.4 Organización de la tesis

En el *Capítulo 1* se recopiló información acerca de la historia de la digestión anaerobia aplicada al tratamiento de residuos, su microbiología, algunas técnicas de Biología Molecular comúnmente aplicadas, así como trabajos recientes que muestran el estado del arte en esta área de estudio. En el *Capítulo 2* se estudió la estructura de las comunidades de arqueas metanogénicas y la vía principal de producción de metano en dos reactores UASB de la industria láctea, uno en fase de arranque y otro en fase de operación estable. El *Capítulo 3* se enfocó en conocer la estructura y dinámica de la comunidad microbiana presente en un reactor UASB modificado para el tratamiento de efluente lácteo, durante su fase de arranque. Mientras que el *Capítulo 4* también se enfocó en conocer la estructura y dinámica de la comunidad microbiana presente en un reactor UASB durante su fase de arranque pero para el tratamiento de vinaza de caña de azúcar. Finalmente en el *Capítulo 5* se realizó una discusión general de los resultados obtenidos y sus conclusiones. En la tabla 1.1 se resume el tipo de reactor, efluente y técnicas empleadas en los capítulos 2, 3 y 4.

Tabla 1. 2 Resumen de los reactores estudiados y las principales técnicas empleadas por capítulo

Reactor UASB	Efluente	Período	Régimen alimentación	Comunidad bacterias	Comunidad de arqueas	Capítulo
1.D (Conaprole)	Lácteo	Start-up (arranque)	Intermitente	Secuenciación masiva 16S de rARN	qPCR 16S de rARN/mcrA AME	2, 3
2.D (Coleme)	Lácteo	Estable	Continuo	--	qPCR 16S de rARN AME/AHE	2
Vinaza (ALUR)	Vinasa	Start-up (arranque)	Continuo	Secuenciación masiva 16S de rARN	qPCR 16S de rARN/mcrA AME	4

1.13 Referencias

- Abbasi, T., Tauseef, S.M., Abbasi, S.A. (2011). Cap. 2. A Brief History of Anaerobic Digestion and "Biogas" En: *Biogas energy* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Abram, F., Enright, A-M., O'Reilly, J., Botting, C.H., Collins, G., O'Flaherty, V. (2010). A metaproteomic approach gives functional insights into anaerobic digestion. *Appl Microbiol*, 110,1550-1560.
- Allison, S.D., Martiny, J.B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS*, 105 (Supplement 1), 11512-11519.
- Alphenaar P.A. (1994). Anaerobic granular sludge: characterization and factors affecting its functioning. PhD thesis, G. Lettinga (promotor), Department of Environmental Technology, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Alvarado, A., Montañez-Hernández, L.E., Palacio-Molina, S.L., Oropeza-Navarro, R., Luévanos-Escareño, M. P., Balagurusamy, N. (2014). Microbial trophic interactions and *mcrA* gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Front Microbiol*, 5, 597.
- Azman, S., Khadem, A.F., Van Lier, J.B., Zeeman, G., Plugge, C.M. (2015). Presence and role of anaerobic hydrolytic microbes in conversion of lignocellulosic biomass for biogas production. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 45(23), 2523-2564.
- Baker, B.J., Dick, G.J. (2013). Omic approaches in microbial ecology: charting the unknown. *Microbe*, 8(9), 353-359.
- Balch, W.E., Fox, G.E., agrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol Rev*, 43(2), 260.
- Barker, H.A. (1936)a. On the biochemistry of the methane fermentation. *Arch Mikrobiol*, 6,404-419.
- Barker, H.A. (1936b). Studies on the methane-producing bacteria. *Arch Mikrobiol*, 7,420-4.
- Barker, H.A. (1956). *Bacterial fermentations* (Vol. 1). New York: Wiley.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., Vavilin, V.A. (2002). Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1), The IWA Taskgroup for Mathematical Modelling of Anaerobic Processes, IWA Publishing, London ISBN 1900222787.
- Béchamp, E., (1868). *Ann Chim Phys*, 13, 103.
- Benitez, A., Ferrari, A., Gutierrez, S., Canetti, R., Cabezas, A., Travers, D., ... & Etchebehere, C. (2006). Sequencing batch reactor as a post-treatment of anaerobically treated dairy effluent. *Water Sci Technol*, 54(2), 199-206.
- Borzacconi, L., López, I., Passeggi, M., Etchebehere, C., Barcia, R. (2008). Sludge deterioration in a full scale UASB reactor after a pH drop working under low loading conditions. *Water Sci Technol*, 57,(5), 797-802.
- Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. (1967). *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Archiv für Mikrobiologie*, 59,(1-3), 20-31.

- Buswell, A.M., Sollo Jr, F. W. (1948). The mechanism of the methane fermentation. *J Am Chem Soc*, 70(5), 1778-1780.
- Buswell, A.M., Hatfield, W.D. (1936)a. Anaerobic fermentations. *Illinois State Survey Bulletin*, 32.
- Buswell, A.M., Boruff, C.S. (1936)b .U.S. Patent No. 2,029,702. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Buswell, A.M., Boruff, C.S., Wiesman, C.K. (1932). Anaerobic stabilization of milk waste. *Ind Eng Chem* 24,1423–1425.
- Cabezas, A., de Araujo, J. C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., ... & Etchebehere, C. (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, 14(4), 555-593.
- Cabezas, A., Draper, P., Etchebehere, C. (2009). Fluctuation of microbial activities after influent load variations in a full-scale SBR: recovery of the biomass after starvation. *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI: 10.1007/s00253-009-2138-x.
- Cabezas, A., Draper, P., Muxí, L., Etchebehere, C. (2006). Post treatment of a slaughterhouse waste-water- stability of the microbial community of a Sequencing Batch reactor operated under Oxygen limited conditions. *Water Sci Technol* 54(2), 215 - 221.
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J.M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr Opin Biotechnol*, 33, 103-111.
- Castelló, E., García y Santos, C., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. *Int J Hydrogen Energy*, 34, 5674- 5682.
- Cavaleiro, A.J., Pereira, M. A., Alves, M. (2008) Enhancement of methane production from long chain fatty acid based effluents. *Biores Technol*, 99(10), 4086-4095.
- Chen, C.L., Wu, J.H., Tseng, I.C., Liang, T.M., Liu, W.T. (2009). Characterization of active microbes in a full-scale anaerobic fluidized bed reactor treating phenolic wastewater. *Microbes Environ* 24,144–153.
- Chen, Z., Hu, D., Zhang, Z., Ren, N., Zhu, H. (2009). Modeling of two-phase anaerobic process treating traditional Chinese medicine wastewater with the IWA anaerobic digestion model no. 1. *Bioresour Technol*, 100, 4623- 4631.
- Christy, P.M., Gopinath, L.R., Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sust En Rev*, 34, 167-173.
- Crocetti, G., Murto, M., Bjornsson, L. (2006). An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). *J Microbiol Methods*, 65, 194- 201.
- De Baere, L. (2000). Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art, *Water Sci Technol*, 41(3), 213-222.

- De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D. H., Boon, N. (2016). The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations. *Water Res*, *104*, 101-110.
- Delforno, T. P., Júnior, L., Vieira, G., Noronha, M. F., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Oliveira, V. M. (2017). Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: integration of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. *MicrobiologyOpen*. DOI: 10.1002/mbo3.443
- Delmont, T.O., Simonet P., Vogel, T.M. (2012). Describing microbial communities and performing global comparisons in the 'omic' era. *ISME J*, *6*,1625-1628.
- Dolfing, J., Griffioen, A., Van Neerven, A.R.W., Zevenhuizen, L.P.T.M. (1985). Chemical and bacteriological composition of granular methanogenic sludge. *Can J Microbiol*, *31*(8), 744-750.
- Dollhofer, V., Podmirseg, S. M., Callaghan, T. M., Griffith, G. W., Fliegerová, K. (2015). Anaerobic Fungi and Their Potential for Biogas Production. En: *Biogas Science and Technology* (pp. 41-61). Springer International Publishing.
- Drake, H.L., Küsel, K., Matthies, C. (2006). Acetogenic prokaryotes. In *The prokaryotes* (pp. 354-420). Springer New York.
- Drake, H. L., Küsel, K., & Matthies, C. (2002). Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*(1-4), 203-213.
- Drake, H.L. (1994). Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA "Wood/Ljungdahl" pathway: past and current perspectives. En: *Acetogenesis* (pp. 3-60). Springer US.
- Driessen, W.J.B.M., Tielbaard, M.H., Vereijken, T.L.F.M. (1994). Experience on anaerobic treatment of distillery effluent with the UASB process, *Water Sci Technol*, *30* (12), 193-201.
- Dunford, E.A., Neufeld, J.D. (2010). DNA stable-isotope probing (DNA-SIP). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (42), e2027-e2027.
- Ferry, J.G. (2015). Acetate Metabolism in Anaerobes from the Domain Archaea. *Life*, *5*(2), 1454-1471.
- Ferry, J.G. (1992). Biochemistry of methanogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *27*(6), 473-503.
- Garcia, J-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. (2002). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* *6*(4), 205-226.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D.D., Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucl Ac Res*, *35*(19), e127.
- Gutierrez, S., Ferrari, A., Benítez, A., Travers, D., Menes, J., Etchebehere, C., Canetti, R. (2007). Long-term evaluation of a sequential batch reactor (SBR) treating dairy wastewater for carbon removal. *Water Sci Technol*, *55*(10), 193-199.
- Habets, L.H.A., Knelissen, H.J. (1997). In line biological water regeneration in a zero

- discharge recycle paper mill. *Water Sci Technol*, 35 (2-3), 41- 48.
- Harada, H., Uemura, S., Chen, A.C., Jayadevan, J. (1996). Anaerobic treatment of a recalcitrant distillery wastewater by a thermophilic UASB reactor. *Biores Technol*, 55(3), 215-221.
- Hedderich, R., Whitman, W.B. (2013). Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. En: *The Prokaryotes*, eds E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Springer Berlin Heidelberg), 635–662.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Gen Res*, 6(10), 986- 94.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10(4), 413- 417.
- Hungate, R.E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol Rev*, 14(1), 1.
- Hwu, C.-S., Tseng, S.-K., Yuan, C.-Y., Kulik, Z., Lettinga, G. (1998). Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Res*, 32(5), 1571–1579.
- Hwu, C.-S., Donlon, B., Lettinga, G. (1996). Comparative toxicity of long-chain fatty acids to anaerobic sludge from various origins. *Water Sci Technol*, 34(5-6), 351–358.
- Imhoff, K. (1938). Sedimentation and digestion in Germany. *Modern sewage disposal*, Lancaster Press, Lancaster, PA, 47.
- Imhoff, K. (1916). Separate sludge digestion improves Imhoff tank operation by keeping sewage fresh. *Eng Record*, 74, 101-102.
- Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H. D., Okabe, S. (2012). Identification and quantification of key microbial trophic groups of methanogenic glucose degradation in an anaerobic digester sludge. *Biores Technol*, 123, 599-607.
- Jaenicke, S., Ander, C., Bekel, T., Bisdorf, R., Droge, M., Gartemann, K-H, Junemann, S., Kaiser, O., Krause, L., Tille, F. *et al.* (2011). Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS One* 2010, 6, 1-15.
- Jain, S., Lala, A.K., Bhatia, S.K., Kudchadker, A.P. (1992). Modelling of hydrolysis controlled anaerobic digestion. *J Chem Technol Biotechnol*, 53, 337-344.
- Jeris, J. S., McCarty, P. L. (1965). The Biochemistry of Methane Fermentation Using ^{14}C Tracers. *J (Water Pollution Control Federation)*, 178-192.
- Karakashev, D., Batstone, D. J., Trably, E., Angelidaki, I. (2006). Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of Methanosaetaceae. *App Environ Microbiol*, 72(7), 5138-5141.
- Kim, J., Lim, J., Lee, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnol Adv* 31(8), 1358–1373. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.05.010
- Lawrence, A.W., McCarty, P. L. (1969). Kinetics of methane fermentation in anaerobic

- treatment. *J (Water Pollution Control Federation)*, R1-R17.
- Lee, C., Kim, J., Hwang, K., O'Flaherty, V., Hwang, S. (2009). Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. *Water Res*, 43(1), 157-165.
- Lee, S-H., Kang, H-J., Lee, Y.H., Lee, T.J., Han. K., Y., Park, H-D. (2012). Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in full-scale anaerobic digesters. *J Environ Monit*, 14, 1893-1905.
- Lettinga, G. (2001). Digestion and degradation, air for life. *Water Science and Technology*, 44(8), 157-176.
- Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., de Zeeuw, W., Klapwijkm, A. (1980). Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol Bioeng* 22(4), 699-734.
- Lettinga, G., Van Velsen, A.F.M., De Zeeuw, W., Hobma, S.W. (1979). Feasibility of the upflow anaerobic sludge blanket (UASB)-process. En: *Environ Engin (1979)* (pp. 35-45). ASCE.
- Lettinga, G., van der Ben, J., & van der Sar, J. (1976). Anaerobe zuivering van het afvalwater van de bietsuikerindustrie. *H2O*, 9, 38-43.
- López, I. (2016). The potential of biogas production in Uruguay. *Renewable Sust En Rev*, 54, 1580-1591.
- López, I., Borzacconi, L. (2010). Modelling of slaughterhouse solid waste anaerobic digestion: determination of parameters and continuous reactor simulation. *Waste Manage*, 30, 1813-1821.
- López, I., Passeggi, M., Pedrezet, A., Borzacconi, L. (2009). Assessment on the performance of a series of two UASB reactors compared against one of the same total volume using Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). *Water Sci Technol*, 59(4), 647 – 652.
- López, I., Passeggi, M., Boix, C., Barcia, R., Borzacconi, L., Lieberman, L. (2007). Generación de lodos y evolución de la biomasa de un reactor UASB a escala real tratando efluente de maltería, *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales*, 1(2), 1-6.
- Marchaim, U. (1992). Biogas processes for sustainable development (No. 95-96). FAO.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ Microbiol*, 10(6), 1571-1581.
- McCarty, P.L. (1964). Anaerobic waste treatment fundamentals. *Pub works*, 95(9), 107-112.
- McKeown, R., Scully, C., Enright, A.M., Chinalia, F., Lee, C., Mahony, T., Collins, G., O'Flaherty, V. (2009). Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *ISME J*, 3, 1231-1242.
- Müller, B., Sun, L., Schnürer, A. (2013). First insights into the syntrophic acetate-oxidizing bacteria—a genetic study. *Microbiol Open*, 2(1), 35-53.

- Nadais, M.H., Capela, M.I., Aroja, L. M. (2006). Intermittent vs continuous operation of upflow anaerobic sludge bed reactors for dairy wastewater and related microbial changes. *Wat Sci Technol*, 54(2), 103–109.
- Narihiro, T., & Kamaçata, Y. (2013). Cultivating yet-to-be cultivated microbes: the challenge continues. *Microbes and Environments*, 28(2), 163-165.
- Narihiro, T., Sekiguchi, Y. (2011). Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microb Biotechnol*, 4(5), 585-602.
- Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z. (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Biores Technol*, 102(4), 3730-3739.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol*, 76(8), 2540-2548.
- Novak, J. T., Carlson, D. (1970). The kinetics of anaerobic long chain fatty acid degradation. *J (Water Pollution Control Federation)*, 1932-1943.
- Omeliansky, M.V. (1899). Sur la fermentation de la cellulose. *Arch Sci Biol (Leningrad)*, 7, 1-434.
- Passeggi, M., López, I., L. Borzacconi, L. (2012). Modified UASB reactor for dairy industry wastewater: performance indicators and comparison with the traditional approach. *J Clean Prod* 26, 90 – 94.
- Passeggi, M., López I., Borzacconi, L. (2009). Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge. *Wat Sci Technol*, 59(3), 501–506.
- Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Mota, M., Alves, M.M. (2004). Mineralization of LCFA associated with anaerobic sludge: kinetics, enhancement of methanogenic activity, and effect of VFA. *Biotechnol Bioeng*, 88(4), 502-511.
- Pereira, M.A., Cavaleiro, A.J., Mota, M., Alves, M.M. (2003). Accumulation of long chain fatty acids onto anaerobic sludge under steady state and shock loading conditions: effect on acetogenic and methanogenic activity. *Water Sci Technol*, 48(6), 33-40.
- Perle, M., Kimchie, S., Shelef, G. (1995). Some Biochemical Aspects of the Anaerobic Degradation of Dairy Wastewater. *Water Res.* 29(6), 1549–1554.
- Pine, M.J., Barker, H.A. (1956). STUDIES ON THE METHANE FERMENTATION XII.: The Pathway of Hydrogen in the Acetate Fermentation 1. *J Bacteriol*, 71(6), 644.
- Rajagopal, R., Saady, N.M.C., Torrijos, M., Thanikal, J.V., Hung, Y.T. (2013). Sustainable agro-food industrial wastewater treatment using high rate anaerobic process. *Water* 5, 292–311.
- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol*, 60(4), 1232-1240.
- Rinzema, A., Alphenaar, A., & Lettinga, G. (1993). Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors. *Process*

Biochemistry, 28(8), 527-537.

- Ripley, L.E., Boyle, W.C., Converse, J.C., (1986). Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. *J WPCF*, 58, 406-411.
- Rittmann, B.E., McCarty, P.L. (2001). *Environmental biotechnology: principles and applications*. McGraw-Hill, New York.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., ... & Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J*, 3(6), 700-714.
- Sayed, S. (1984). Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using a flocculent sludge UASB reactor. *Agric Wastes* 11, 197–226.
- Sayed, S. (1987). Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using a granular sludge UASB reactor. *Biol Wastes* 21, 11–28.
- Schink, B. (1997). Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 262–280.
- Schlegel, K., Müller, V. (2013). Evolution of Na⁺ and H⁺ bioenergetics in methanogenic archaea. *Biochem Soc Trans*, 41(1), 421-426.
- Schmidell, W., Moreira Soares, H., Etchebehere, C., Menes, R. J., Bertola, N. C., Contreras, E. M. (Ed) (2007). *Tratamiento Biológico de águas residuárias*. Editora Tribo da Ilha. Florianopolis- SC. Brasil.
- Schnürer, A., Zellner, G., & Svensson, B. H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS microbiology ecology*, 29(3), 249-261.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 1280-1288.
- Smith, K.S., Ingram-Smith, C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol*, 15,150–5.
- Soehngen, N.L. (1910). Sur le role du methane dans la vie organique. *Recueil des Travaux Chimiques* 29, 238–274.
- Song, M., Shin, S. G., Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Biores Technol*, 101(1), 23-28.
- Sousa, D.Z., Smidt, H., Alves, M. M., Stams, A.J. (2009). Ecophysiology of syntrophic communities that degrade saturated and unsaturated long-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Ecol*, 68(3), 257-272.
- Speece, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, USA.

- Speece, R.E., McCarty, P.L. (1964). Nutrient requirements and biological solids accumulation in anaerobic digestion. *Advan Wat Poll Res*, 2, 305-322.
- Stadtman, T.C., Barker, H.A. (1949). Studies on the methane fermentation; tracer experiments on the mechanism of methane formation. *Arch Biochem*, 21(2), 256-264.
- Stander, G.J. (1950). Effluents from Fermentation Industries. Part IV (1). A New Method for increasing and maintaining Efficiency in the Anaerobic Digestion of Fermentation Effluents. *Pub Health*, 14(9), 263-73.
- Sun, L., Müller, B., Westerholm, M., Schnürer, A. (2014). Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *J Biotechnol*, 171, 39-44.
- Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H. Karlsson, A. (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol*, 85(3), 612-626.
- Tappeiner, W. (1882). Ueber Celluloseverdauung. *er. Deut. Chem.*, 15(1), 999-1002.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*, 41(1), 100.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol* 6, 579–591.
- Tiwari, M.K., Guha, S., Harendranath, C.S., Tripathi, S. (2006). Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(2), 145-154.
- Town, J.R., Links, M.G., Fonstad, T.A., Dumonceaux, T.J. (2014) Molecular characterization of anaerobic digester microbial communities identifies microorganisms that correlate to reactor performance. *Biores Technol*, 151, 249-57. doi: 10.1016/j.biortech.2013.10.070. Epub 2013 Oct 30.
- Van Lier, J.B., Mahmoud, N., Zeeman, G. (2008). Anaerobic biological wastewater treatment. In: Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjamovic D (eds) Biological wastewater treatment: principles, modeling and design. IWA Publishing, London.
- Van Lier, J.B., Van der Zee, F.P., Frijters, C.T.M.J., Ersahin, M.E. (2015). Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Reviews in Environ Sci BioTechnol*, 14(4), 681-702.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Ho, D.P., Batstone, D.J., Tyson, G.W. (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol*, 27, 55-64.
- Vavilin, V.A., Rytov, S.V., Lokshina, L. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Biores Technol*, 56, 229-237.
- Verstraete, W., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys, B., De Vos, P., Van de Wiele, T., Boon, N. (2007). Microbial resource management: the road to go for environmental biotechnology. *Eng Life Sci*, 7(2), 117-126.
- Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., Lema, J.M. 2000 Influence of the content in fats and

- proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresour Technol*, 74, 231–239.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T.A., Beers, A.R., Knight, R., Angenent, L.T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *PNAS*, 108, 4158-4163.
- Westerholm, M., Dolfig, J., Sherry, A., Gray, N. D., Head, I.M., Schnürer, A. (2011). Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ Microbiol Reports*, 3(4), 500-505.
- Whitman, W.B., Boone, D.R., Koga, Y., Keswani, J. (2001). Taxonomy of methanogenic Archaea. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 211-294.
- Widder, S., Allen, R.J., Pfeiffer, T., Curtis, T. P., Wiuf, C., Sloan, W. T., ... Kettle, H. (2016). Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J*, 10, 2557–2568.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1),130–1, 134–8.
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS*, 74(11), 5088-5090.
- Xia, Y., Wang, Y., Fang, H.H., Jin, T., Zhong, H., Zhang, T. (2014). Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. *Sci Reports*, 4, 6708.
- Yang, Y., Yu, K., Xia, Y., Lau, F.T., Tang, D.T., Fung, W.C., ...& Zhang, T. (2014). Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(12), 5709-5718.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89, 670-679.
- Zakrzewski, M., Goesmann, A., Jaenicke, S., Junemann, S., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Al-Soud, W.A., Sorensen, S., Puhler, A., Schluter, A. (2012). Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *J Biotechnol*, 158,248-258.
- Ziganshina, A.M., Liebetrau, J., Proter, J., Kleinstaub, S. (2013). Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97,5161-5174.
- Zinder, S.H. (1994). Syntrophic acetate oxidation and “reversible acetogenesis”. En: *Acetogenesis* (pp. 386-415). Springer US.

CAPÍTULO 2

**COMUNIDADES METANOGENICAS EN REACTORES DE
EFLUENTE LÁCTEO: ARQUEAS METANOGENICAS EN
REACTORES UASB INDUSTRIALES**

Resumen del capítulo 2

Una de las interrogantes actuales en el modelo de la digestión anaerobia es la vía metabólica principal por la que se produce el metano en sistemas a escala real. Dependiendo de las condiciones ambientales, el metano se puede producir por la vía acetoclástica o en su defecto la hidrogenotrófica. La predominancia de una u otra vía metabólica estaría determinada por el tipo de sustrato, la temperatura o las concentraciones de acetato y amonio dentro del reactor, entre otros. En este capítulo se exploraron las estructuras de las comunidades de arqueas presentes en dos reactores UASB a escala real que trataron efluente de la industria láctea, para conocer las abundancias de grupos potencialmente hidrogenotróficos y acetoclásticos, empleando un abordaje independiente de cultivo. Uno de los reactores fue monitoreado durante su fase de arranque y el otro, en su octavo año de operación estable. Se analizaron muestras de lodos obtenidas de cada reactor durante aproximadamente un año. Se utilizó la técnica de PCR cuantitativo o Q-PCR del gen *rARN de 16S*, de cuatro órdenes de arqueas metanogénicas así como dos familias de acetoclásticas. Además, se realizaron actividades metanogénicas específicas empleando acetato o una mezcla de H_2/CO_2 . Las comunidades de metanogénicos presentes en los dos reactores presentaron una co-dominancia de dos órdenes específicos, los *Methanosarcinales* (acetoclásticos) y los *Methanobacteriales* (hidrogenotróficos). Las arqueas hidrogenotróficas presentaron la mayor abundancia revelando la importancia de este grupo de arqueas en los reactores estudiados. El trabajo experimental en este capítulo fue realizado en su totalidad por la autora de esta tesis. La cuantificación mediante Q-PCR fue realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional de Irlanda (NUI) en la ciudad de Galway, durante una pasantía en 2013. Parte de los resultados de este capítulo fueron presentados oralmente en el XI Simposio Latinoamericano de Digestión Anaerobia, en la ciudad de La Habana, Cuba, en el año 2014.

Title: Hydrogenotrophic methanogens dominance in two full-scale UASB reactors treating dairy wastewater

Callejas, C.^a, Collins, G.^b, Porca, E.^b, Etchebehere, C.^c and Borzacconi, L.^a

^aBiotecnología de Procesos para el ambiente, Instituto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.

^bMicrobiology Dept., School of Natural Sciences, National University of Ireland, Galway, Ireland

^cLaboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay

Correspondence to: Cecilia Callejas, ceciliac@fing.edu.uy. Biotecnología de Procesos para el Ambiente, Instituto de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Herrera y Reissig 565, Montevideo, Uruguay; phone: +5982 7110871 (ext.111); fax: +5982 27115445; E-mail: ceciliac@fing.edu.uy; Website: <http://www.fing.edu.uy/iiq/IIQ.html>

Abstract

Acetoclastic methanogenesis has been proposed to be responsible for 65-70% of the CH₄ formation in anaerobic reactors. However, this paradigm is currently in controversial. In this work, the methanogenic community of two full-scale UASB reactors was analysed in samples taken along one year. The reactors treated dairy wastewater, one of the reactors was during the start-up period and the other was in stable operation. Quantitative PCR was performed to target the 16S rRNA gene copies of four taxonomical orders of methanogenic archaea. The results showed that *Methanobacteriales* (hydrogentrophic) were co-dominant in the reactor during start-up (40%) and dominant in the reactor stable, while, the *Methanosarcinales* (hydrogentrophic and acetoclastic) represented the other 60% and 20% respectively. Specific methanogenic activities tested in one of the reactors confirm these results. This work showed the importance of methanogenesis via hydrogen in full-scale systems to treat dairy wastewater.

Keywords

Acetoclastic, hydrogenotrophic, methanogenesis, full-scale reactor, qPCR, 16S rRNA gene.

2.1 Introduction

The final step in the anaerobic degradation pathway is accomplished by a group of strictly anaerobic archaea called “methanogens”, which catalyse the reduction of organic compounds in the form of acetate or alternatively, CO₂ to produce methane (CH₄). Methanogenesis is often the rate-limiting step in the overall process. All the methanogens are members of the *Euryarcheota* phylum and belong to four different taxonomical orders (Whitman *et al.*, 2001). Furthermore, they can be classified into hydrogenotrophic (HM) or acetoclastic methanogens (AM), according to the substrate (H₂/CO₂ or acetate and methyl compounds, respectively) utilization for methane production (García *et al.*, 2000).

Acetoclastic methanogens use acetic acid as part of their energy metabolism, reducing the methyl group to CH₄ and oxidizing the carbonyl group to CO₂. They belong to two Families (*Methanosarcinaceae* and *Methanosaetaceae*) within the order *Methanosarcinales* (MSL). Only a few methanogenic genera are exclusively acetoclastic, all the members of the *Methanosaethaceae* are examples of acetoclastic metabolism. The Family *Methanosarcinaceae* also contains some mixotrophic members capable of hydrogenotrophic metabolism (HM) as well. Alternatively, hydrogenotrophic methanogens reduce CO₂ to CH₄ with H₂ as electron donor and are represented by three different taxonomical orders; *Methanobacteriales* (MBT), *Methanococcales* (MCC) and *Methanomicrobiales* (MMB).

Those two metabolisms are linked by the inter-conversion between acetate and H₂/CO₂. Syntrophic acetate oxidation (SAO) is carried out by some bacteria like *Clostridium ultunense* (Schnürer *et al.*, 1996), *Tepidanaerobacter acetatoxydans* (Westerholm *et al.*, 2011), and *Syntrophaceticus schinkii* (Westerholm *et al.*, 2010) that convert acetate to H₂/CO₂. The reverse reaction is called homocetogenesis and species of *Acetobacterium*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Sporomusa* have been reported (Guo *et al.*, 2006).

In pioneer physiological works done by Jeris & Mc Carthy, 1965 and Smith & Mah 1966, the acetoclastic methanogenesis was proposed to be responsible for more than 65-70% of the CH₄ formation in anaerobic sludges. Subsequently, it became a paradigm to assess the global methanogenic activity in anaerobic reactors. Moreover, the idea has been reinforced in the ADM1 model of anaerobic digestion, broadly used by researchers in simulation analysis (Batstone *et al.*, 2006). However, in recent microbiological studies in which some methanogenic communities were analysed by genomic methods (such as pyrosequencing, clone libraries and quantitative PCR), the hydrogenotrophic guild was identified as the dominant methanogenic group in stressing conditions, such as high ammonium concentration (Lee *et al.*, 2009, Song *et al.*, 2010, Jang *et al.*, 2014). However, quantitative data of the different phylogenetic groups of methanogens linked to their methanogenic activities *in situ* is necessary to support this hypothesis.

In this work, the methanogenic community structure of two UASB full-scale dairy wastewater treatment reactors were analysed and compared by qPCR and clone libraries of the 16S rRNA gene. Specific methanogenic activities were assayed in order to support the genetic results. One of the reactors was in the start-up period, while the other was in a stable operation period.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Full scale reactor's sample collection

Samples were collected from the granular sludge bed of two modified UASB full-scale reactors (Passeggi *et al.*, 2009) used for the treatment of the wastewater from two dairy industries located in Uruguay. Both reactors were inoculated with sludge from anaerobic ponds treating slaughterhouse wastewater. One of the reactors (1.D) had a volume of 100 m³. The reactor was sampled during the start-up phase. The feeding regime was intermittent, applying an average organic loading rate (OLR) between 1-3 kgCOD.m⁻³d⁻¹. The other reactor (2.D) was in its 8th year of stable continuous operation and had an average OLR

of 3.5 kgCOD.m⁻³.d⁻¹ and its design was as two parallel modules of 40 m³ each one. The reactor 2.D was started up using intermittent feeding as well, but switched to continuous mode after six months. Reactor 1.D was sampled every two weeks while reactor 2.D was sampled monthly. Sludge-bed samples (1,5 L) were collected and stored at 4°C until analysis. A subsample (10 mL) was centrifuged at 10³ rpm for 10 min and the pellet was stored at -20°C for genomic analysis. Samples were collected from the sludge bed blanket in both reactors.

Table 2. 1. Operational conditions in the two UASB full-scale reactors.

Reactor	COD removal* (%)	HRT* (h)	pH*	OLR* (kgCOD.m ⁻³ .d ⁻¹)	Volume (m ³)
1.D	90%	17	7.1	3.5	100
2.D	>85%	20-50	6.4	2.4	40+40

* Average value over time series

2.2 Genomic DNA purification and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) of 16S rRNA gene

A fully automated nucleic acid extractor (Maxwell® 16 Research System, Promega, USA) employing paramagnetic beads technology was used to extract DNA from sludge samples. For each sample, 50 mg of sludge was added to a pre-filled cartridge provided by the manufacturer (Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit, Promega, USA). DNA was quantified using a Qubit 2.0® fluorimeter (© 2014 Thermo Fisher Scientific Inc) and quality was evaluated by gel electrophoresis. Taxonomical orders of methanogenic archaea (*Methanobacteriales* (MBT); *Methanomicrobiales* (MMB); *Methanococcales* (MCC) and *Methanosarcinales* (MSL) were quantified by real-time PCR (qPCR) using a commercial kit, containing primers and hydrolysis probes directed to the 16S rRNA gene for each group (Table 2.2). qPCR amplifications were done using a Lightcycler LC 480 (Roche, Mannheim, Germany). Reactions were performed with FastDNA Master Hybridization Probes Kit (Life Technologies). The standard curves were constructed as previously described, using plasmids with inserted 16S rRNA genes from representative strains of each target group (Yu *et al.*, 2005). DNA concentrations of each plasmid miniprep were quantified using Qubit®. For each standard curve, a 10-fold serial dilution from 10⁹ to 10¹ copies,µL⁻¹ was

generated. Each master mix was performed in a total volume of 20 µl using 10 µM of each primers and probe, following the manufacturer's instructions (Life Technologies, USA). 5 µL of template DNA (1:10 dilution) was used per reaction, each sample including standards were analysed in duplicates. The resulting concentration of 16S rRNA copies was calculated using the following equations:

$$\text{conc. 16S rRNA}(\text{copy} \cdot \mu\text{l}^{-1}) = \frac{\text{16S rRNA concentration}(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \times 6 \times 10^{23} (\text{copy} \cdot \text{mole}^{-1})}{\text{16S rRNA amplicon size (bp)} \times 660 (\text{g 16S rDNA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{bp}^{-1})}$$

$$\text{conc. 16S rRNA} (\text{copy} \cdot \text{ng DNA}^{-1}) = \frac{\text{conc. 16S rRNA} (\text{copy} \cdot \mu\text{l}^{-1}) \times \text{dilution}}{\text{conc. DNA} (\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1})}$$

Table 2. 2. 16S rRNA gene sequences from primers and probes sets used in this work (Yu *et al.*, 2005) and representative methanogenic strains used as positive controls and their catalogue numbers in the DSMZ collection

Target taxa: Order	Strain (16S rRNA plasmid)	DSMZ Acc. Nº.	Primers	Function	Sequence (5'-3')
	<i>Methanobacterium</i>				
<i>Methanobacteriales</i> MBT (H) ^a	<i>formicum</i> st. M.o.H.	DSM863	MBT857F MBT929F MBT1196R	F primer probe R primer	CGWAG GGAAG CTGTT AAGT AGCAC CACAA CGCGT GGA TACCG TCGTC CACTC CTT
	<i>Methanococcus voltae</i>				
<i>Methanococcales</i> MCC (H) ^a	st. PS	DSM1537	MCC495F MCC686F MCC832R	F primer probe R primer	TAAGG GCTGG GCAAG T TAGCG GTGRA ATGYG TTGAT CC CACCT AGTYC GCARA GTTTA
	<i>Methanospirillum</i>				
<i>Methanomicrobiales</i> MMB (H) ^a	<i>hungatei</i> st. JF-1	DSM864	MMB282F MMB749F MMB832R	F primer probe R primer	ATCGR TACGG GTTGT GGG TYCCGA CAGTG AGGRA CGAAA GCTG CACCT AACGC RCATH GTTTA C
	<i>Methanosarcina</i>				
<i>Methanosarcinales</i> MSL(H/A) ^{a,b}	<i>acetivorans</i> st. C2A	DSM2834	MSL812F MSL860F MSL1159R	F primer probe R primer	GTAAA CGATR YTCGC TAGGT AGGGA AGCCG TGAAG CGARC C GGTCC CCACA GWGTA CC

^a (H) Hydrogentrophic, ^b (A) Aceticlastic

2.2.3 Clone libraries and sequence analysis

Two samples were selected to construct clone libraries of the archaeal 16S rRNA gene. A nested PCR was carried out to amplify a region of the gene. The first PCR reaction used primers Arch21F (5'TTCCGGTTGATCCYGCCGGA3') and Arch1392R (5'ACGGGCGGTGTGTACA3') and the second PCR used Arch21F (5'TTCCGGTTGATCCYGCCGGA3') and Arch958R (5'YCCGGCGTTGAMTCCAATT3') (DeLong, 1992). Each reaction mixture had a total volume of 30 μ L, containing 50 ng of template DNA, 1x reaction Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M dNTPs, 0.2 M of each primer and 2.5 U Taq DNA Polymerase (Kapa). Negative control was included in all experiments. Amplification was done in a MultiGene Mini thermal cycler TC020-24 (Labnet, USA) programmed as follows: first PCR was 94 °C (5 min), followed by 30 cycles of 94 °C (1 min), 56 °C (1 min), 72 °C (1:30 min) and a 7 min extension step at 72 °C. The second PCR was 94 °C (5 min), followed by 30 cycles of 94 °C (45 min), 56 °C (45 min), 72 °C (1 min) and a 7 min extension step at 72 °C. Two PCR products from the same sample was mixed and then used to construct each clone library. Cloning and sequencing were done at Macrogen Sequencing Service (Korea) using Blunt Ends.

Sequences were analysed per library using Mothur v.1.35.0 (Schloss *et al.*, 2009). Filtering consisted in removing those sequences shorter than 200 bp and with average quality values below 25 in a moving window of 50 bp from the raw dataset. Putative chimeric sequences were identified using chimera.uchime command. Primers were removed. The final data set contained 123 sequences and was compared to two different sequence databases. These were Gen-Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, BLASTN algorithm), and the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>, 'Classifier' tool). For operational taxonomic unit (OTU) analysis, a Mothur pipeline was applied. Each clone library was aligned to Greengenes database template alignment (http://www.mothur.org/wiki/Greengenes-formatted_databases), and distance matrix was calculated. Then, the OTUs were clustered using the furthest neighbour-clustering algorithm at evolutionary distances of 3 %. Rarefaction curves were constructed and diversity in each sample was analyzed with two

estimators: Shannon (Shannon & Weaver, 1948) and Chao 1 (Chao, 1984). For phylogenetic tree inference, the MEGA 6.0 package was used (Tamura *et al.*, 2013), sequences of representative OTUs and sequences closely related from methanogenic archaeal obtained from RDP database (Cole *et al.*, 2014) were aligned in T_coffe (Notredame, *et al.*, 2000) and analysed by Neighbour Joining using Mega 6.0 software with setting of 1000 bootstrap replications.

2.2.4 Specific methanogenesis activity (SMA) tests

Specific methanogenic activity (SMA) using H₂/CO₂ (80:20) (Coates *et al.* 1996), or acetate (Soto & Lema 1993) as substrates was tested in a sample taken from the reactor 2.D. For that, the methods previously reported were used with some modifications. Briefly, a sludge sample (300-400 mg VSS) were added to a 136 mL total volume vessels containing 2.0 g.L⁻¹ of acetate, in a final liquid volume of 100 mL or in 308 mL vessel containing H₂/CO₂ (80:20) at a pressure of 1 atm and 100 mL liquid volume. The vessels were incubated at 30 °C with agitation at 150 rpm. Acetoclastic activity was determined by measurements of the increase of the pressure in the headspace and the CH₄ composition of the biogas, analysed in a Gas Chromatographer GC 14-B with a TCD detector (SHIMADZU, Japan). The hydrogenotrophic activity was determined by measurements of the reduction of the headspace pressure over time using a pressure transducer.

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Methanogenic Archaea monitoring by qPCR

The 16S rRNA gene sequences from the different methanogenic strains used as positive controls in this work are described in Table 2.2. The different standard curves for the qPCR analysis had a linear correlation coefficient (r^2) ranging between 0.997 and 0.999 and the efficiencies of the reactions (E) varied between 2.03-2.5, with an error < 0.12. The primers and probes used in this work were previously described by Yu *et al.* (2005) and are listed in Table 2.2.

The 16S rRNA gene copy number/ng DNA of the four key methanogen orders, *Methanosarcinales* (MSL), *Methanobacteriales* (MBT), *Methanomicrobiales* (MMB) and *Methanococcales* (MCC) were determined in the sludge samples collected in different times from the two reactors (Figure 2.1, Table 2S.1). The hydrogenotrophic order *Methanobacteriales* (MBT) was the most abundant order and showed a concentration range between $2.1\text{-}9.7 \times 10^5$ copies.ng⁻¹ DNA in the reactor 1.D (start-up) and $1.3\text{-}4.6 \times 10^6$ copies.ng⁻¹ DNA in the reactor 2.D (stable). The order *Methanosarcinales*, which contains acetoclastic (*Methanosaeta*) but also mixotrophic (hydrogenotrophic/acetoclastic) *Methanosarcina* members was the second more relevant group. *Methanosarcinales* (MSL) showed a broader variation of two orders of magnitude in its concentration range ($9.3 \times 10^4\text{-}3.2 \times 10^6$ copies.ng DNA⁻¹ in the reactor 1.D and $1.5 \times 10^5\text{-}1.7 \times 10^6$ copies.ng DNA⁻¹ in the reactor 2.D). However, the analysis of the *Methanosarcinales* at Family level showed that the acetoclastic were the dominant members in this taxonomical order (data not shown). The hydrogenotrophic order *Methanomicrobiales* was in very low concentration compared to the other two groups of methanogens (presenting values of $6 \times 10^1\text{-}6 \times 10^2$ copies.ng⁻¹ DNA in the reactor 1.D and $9 \times 10^1\text{-}2.3 \times 10^3$ copies.ng⁻¹ DNA in the reactor 2.D). The order *Methanococcales* was not detected in the experimental conditions.

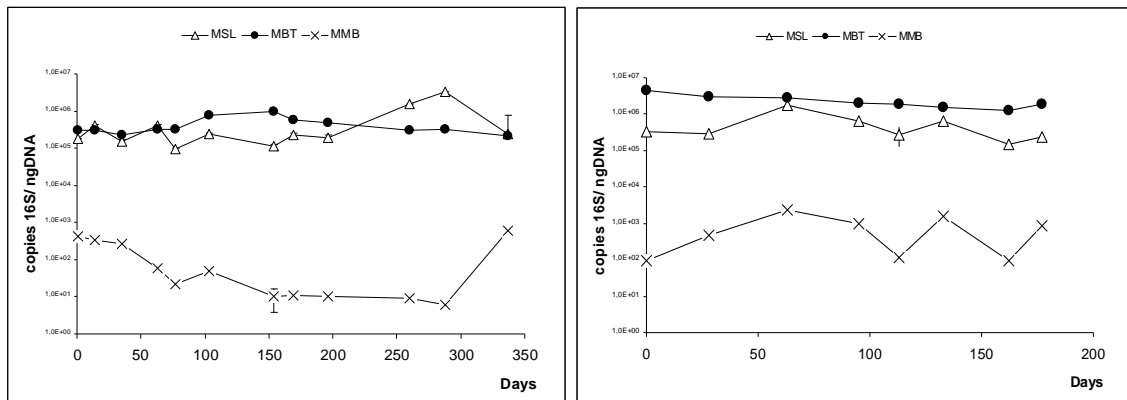


Figure 2. 1. 16S rRNA gene copy numbers per ng of DNA quantified by qPCR in reactor 1.D (left) and 2.D (right) describing the methanogen community structure over time. Circle: *Methanosarcinales*, Triangle: *Methanobacteriales* and Cross: *Methanomicrobiales*. Error bars are shown.

The results showed a similar methanogenic community structure in both reactors, with a dominance of *Methanobacteriales* over *Methanosarcinales* and a lower abundance of *Methanomicrobiales* (Figure 2.1). As shown in Fig. 2.1 there was not high variations in the structure of the communities during the period studied, suggesting stability in terms of relative abundances of the methanogens over time, even in the reactor during the start-up period (reactor 1.D).

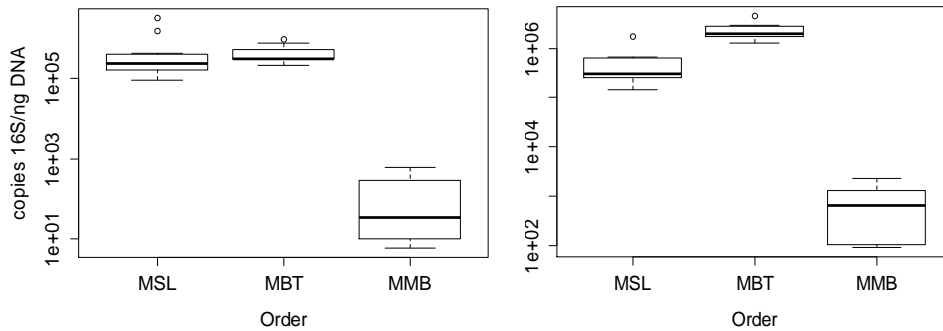


Figure 2. 2. Boxplot of the *16S rRNA* gene copy numbers per ng of DNA in the samples from the reactor 1.D and 2.D. *Methanosarcinales* (MSL), *Methanobacteriales* (MBT) and *Methanomicrobiales* (MMB).

When comparing the mean values of the different groups of methanogens for each reactor during the period studied, (Fig. 2.2) a similar pattern was observed: *Methanobacteriales* (hydrogenotrophic) represented on average 44% and 80% of the total methanogens in reactor 1.D and 2.D, respectively. The *Methanosarcinales* (hydrogenotrophic and acetoclastic) represented the other 56% and 20% in reactor 1.D and 2.D while *Methanomicrobiales* (hydrogenotrophic) were less than 1%. The *Methanosarcinales* had on average, similar concentrations in both reactors (5.4 and 5.9×10^5 copies.ngDNA⁻¹) whereas *Methanobacteriales* had a similar concentration in the reactor in the start-up period (4.3×10^5 copies.ngDNA⁻¹ in 1.D) but had one order of magnitude of difference in the reactor during stable operation (2.4×10^6 copies.ngDNA⁻¹ in 2.D). One possible hypothesis to explain these results could be that in the stable reactor, which was operated for a longer period, the methanogenic community could have had the time to be settled, allowing the hydrogenotrophic guild to become dominant because of the inhibitory effect of the high fat concentration present in the reactor (40 % of the dairy wastewater). Moreover, the results found

in this work have shown that methanogenesis using hydrogen would be dominant in these full-scale reactors.

Previous work has shown the hydrogenotrophic methanogenesis dominance in different anaerobic reactors in response to stress conditions such as high ammonium concentration, volatile fatty acids accumulation, potassium or sodium concentrations (Schnurer *et al.*, 1999, Demirel, Song *et al.*, 2010, 2014) or in reactors operated at low temperatures (Bialek *et al.*, 2012). *Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales* were also reported in a batch reactor treating whey permeate (Lee *et al.*, 2009). However, the relative abundances of the different groups must be taken cautiously due to the inherent bias of this approach, for example, the differences in the 16S rRNA operon copy number per genome or the specificity of the probes with the different genera. Then, the results found in this work were taken as a semi-quantitative approach to reveal the community structure and not to determine the real number of different methanogens in the system.

2.3.2 Dominant methanogenic Archaea groups in the reactors

To identify the dominant members of the methanogenic communities, archaeal 16S rRNA clone libraries were performed in one sample selected from each reactor. After filtering, 62 sequences from reactor 1.D and 61 sequences from reactor 2.D were obtained sequences were clustered in 12 OTUs for reactor 1.D sample and 5 OTUs for reactor 2.D sample when 3% distance was used as cut-off. The higher OTU number in the sample from reactor 1.D would suggest a higher diversity of Archaea the reactor that was during the start-up period. The biomass from reactor 1D was probably during adaption period as the reactor was inoculated using sludge from an anaerobic pond and was submitted to a the new environment. On the converse, the reactor 2.D had a history of stable operation of eight years. When the coverage was calculated, a 96% and 88% were obtained for the samples taken from reactor 1.D and 2.D respectively, indicating a good coverage of the diversity present in both samples. The OTUs representative sequences were compared with sequences from public databases (NCBI and RDP) obtaining similar results. All the sequences retrieved belonged to

Euryarcheota phylum, 10 OTUs representing 57 sequences from the reactor 1.D and 2 OTUs representing 50 sequences from the reactor 2.D, showed a high percentage of identity with sequences from two *Methanosaeta* members, which are exclusively acetoclastic methanogens. These two sequences become from *Methanosaeta concilii* (Accessing number NR_102903.1) obtained in a genome project (Barber *et al.*, 2011) and from another strain (NR_104707.1) isolated from a marine environment (Accessing number NR_104707.1) (Mori *et al.*, 2012). On the other hand, only one OTU representing two sequences in the sample taken from reactor 1.D and three OTUs representing 11 sequences in the sample taken from reactor 2.D showed phylogenetic affiliation with *Methanobacteriales*. Those OTUs showed different percentages of similarity with sequences from two strains: *Methanobacterium petrolearium* Mic5c12 (Accessing number NR_113044.1), isolated from a salty environment (Mori *et al.*, 2012) and *Methanobacterium beijingense* 8-2 (NR_028202.1) isolated from an anaerobic digester (Ma *et al.*, 2005). Results are summarized in Table 2.3.

Table 2. 3. Representative OTUs and their taxonomic assignment by BLAST in NCBI

OTU	Reactor	Strain	Length pb	%Identity	Acc. Nº	Abund %
OTU01	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	723	97	NR_104707.1	40
OTU02	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	604	100	NR_102903.1	37
OTU03	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	612	98	NR_104707.1	5
OTU04	1.D	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12	397	95	NR_113044.1	3
OTU05	1.D	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DSM 15978	555	98	NR_102454.1	3
OTU06	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	717	94	NR_104707.1	2
OTU07	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	620	94	NR_102903.1	2
OTU08	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	720	97	NR_102903.1	2
OTU09	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	582	97	NR_102903.1	2
OTU10	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	523	94	NR_104707.1	2
OTU11	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	683	94	NR_104707.1	2
OTU12	1.D	<i>Thermocodium modestius</i> strain IC-125	511	83	NR_040779.1	2
OTU01	2.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	540	100	NR_104707.1	56
OTU02	2.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	378	100	NR_102903.1	26
OTU03	2.D	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2	547	99	NR_028202.1	15
OTU04	2.D	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2	525	98	NR_028202.1	2
OTU05	2.D	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12	379	96	NR_113044.1	2

As shown in Figure 2.3, most of the OTUs sequences were closely related with sequences from the acetoclastic *Methanosaeta concilii* strains. In the sample from the reactor 1.D those sequences represented 57 out of 61 and in the sample from the reactor 2.D 50 sequences out of 62.

The cloning results were expected to reproduce those of the qPCR, with a higher proportion of sequences representing members of the *Methanobacteriales* (44% in the sample from 1.D and 80% in the sample from 2.D). However, when the community structure was analysed by cloning and sequencing, striking differences emerged. The cloning strategy suggested a dominant acetoclastic community since most of the sequences clustered with sequences from *Methanosaeta* members (90% in the sample from 1.D and 80% in the sample from 2.D). Those percentages were in both cases higher than the ones found with the qPCR approach (60% in 1D and 20 %in 2.D), in which the *Methanobacteriales* resulted the dominant order. The apparently contradiction between both results obtained could be explained by the bias introduced by the nested strategy and the universal primers used in the clone libraries. Pinto *et al.*, (2012) have shown that end point PCR distorts microbial communities using samples from anaerobic systems in highthroughput sequencing.

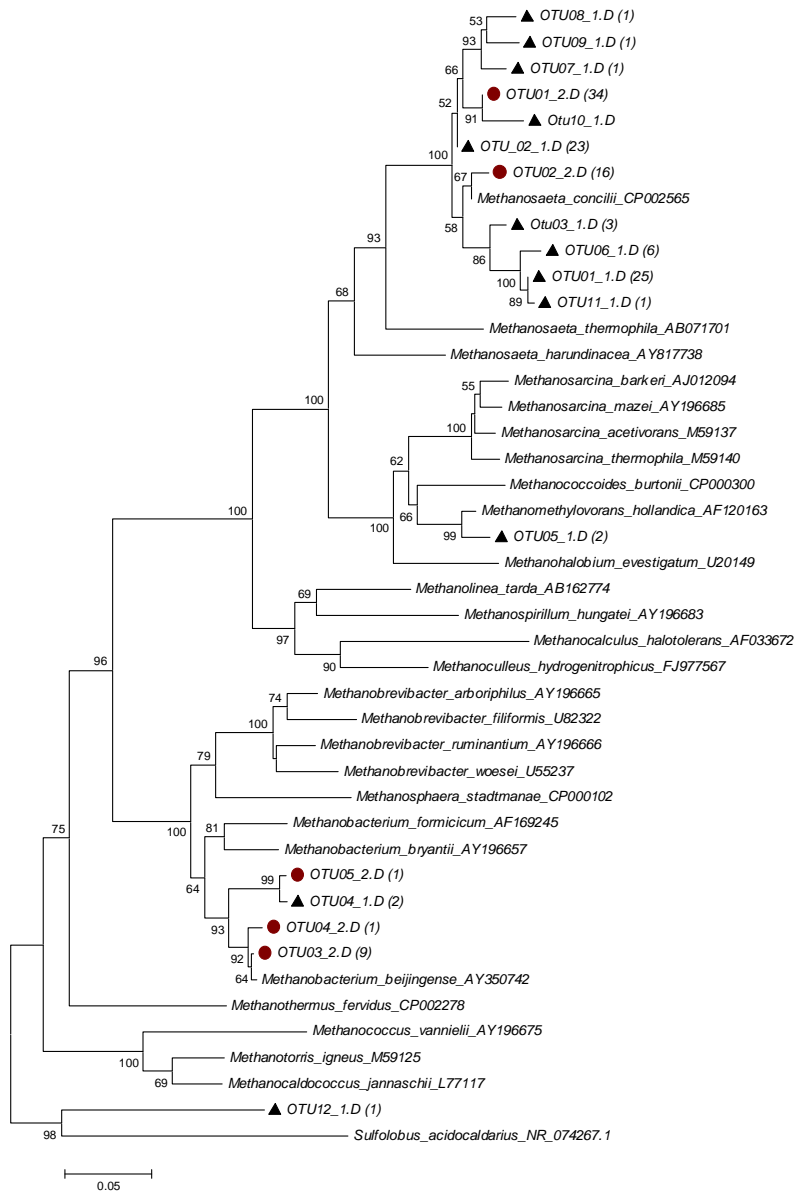


Figure 2. 3. Rooted phylogenetic tree showing representative sequences of methanogenic archaea sequences and the representative OTUs calculated in this analysis. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method and 1000 replicates bootstrap. *Sulfolobus acidocladarius* was used as outgroup taxon. Triangle (▲) : reactor1.D; Circle (●) : reactor 2.D. Number of sequences contained in each OTU are indicated in parenthesis.

When the coverage of the primers used in this work was analysed with the online tool Probematch from RDP, only 56 out of 15,395 (0.3%) sequences matched in the order *Methanobacteriales*, while 633 out of 34,253 (2.0%) sequences matched within the order *Methanosarcinales* (consulted in April, 2015). This result highlights the importance of the universal primers used to reveal the diversity of microorganisms in any environment. In this case, the primers were

useful to reveal, on a phylogenetic basis, the dominant groups of methanogenic Archaea but they were quite poor to draw any conclusion about the structure of the community.

2.3.3 Specific methanogenic activity tests

In order to confirm the importance of the hydrogenotrophic methanogenesis in the reactors we conducted specific methanogenic activity (SMA) tests, using both H_2/CO_2 and acetate as substrates in samples taken from the reactor 2.D (stable operation). The results showed a similar tendency as the qPCR results, the activity using acetate was $0.33 \pm 0.02 \text{ gCOD.VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and the activity using hydrogen was $0.45 \pm 0.15 \text{ gCOD.VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$. It is important to stress that activity values are referred to the volatile suspended solids (VSS) of the sludge, and not to the amount of VSS of each specific population. Since the 16S rRNA copy number of hydrogenotrophic methanogens found in this work was on average one order of magnitude higher than those acetoclastic ones, then, the specific activities of the acetoclastic population should be higher than the hydrogenotrophic ones. These results are in accordance with a recent study in which the methanogenic pathways in an anaerobic reactor treating cellulose were studied by means of a metagenomic approach (Xia *et al.*, 2014). The authors showed that even when the acetoclastic population showed to be less abundant; it had significantly higher overall transcriptional activity in methanogenesis than its hydrogenotrophic counterparts. On the other hand, the physiological studies focused in testing the specific methanogenic activities (SMAs) using CO_2 and H_2 or acetate as substrates, in the same sludge are scarce. In 2008, Molina *et al.*, have shown that the hydrogenotrophic SMA was higher than the acetoclastic SMA in samples taken from three lab-scale reactors fed with different effluents.

There is a vast literature referring to the acetoclastic pathway being responsible for 70% of the methane production in anaerobic reactors and thus to the acetoclastic microorganisms as the principal methanogenic group involved in methane biosynthesis (Jeris & Mc Carthy, 1965, Karkashev *et al.*, 2005). Although, as it has mentioned before some recent studies have shown that

hydrogenotrophic methanogenesis can play an unexpectedly important role in the methane biosynthesis, some of them under inhibitory conditions such as high ammonium concentrations (Laukermann *et al.*, 2010, Jang *et al.*, 2014). Moreover, since hydrogenotrophic methanogenesis is more energetically favourable than acetoclastic methanogenesis (Smith & Mah, 1966), it is likely that hydrogenotrophs would be more abundant in terms of cell number than their acetoclastic counterparts.

The apparently disagreement between the literature and the results described above could be explained by the fact that i) the pioneer physiological studies that determined the major pathways in methane formation were done using mainly aerobic activated sludge as substrates ii) the homoacetogenesis impact in the whole anaerobic digestion process was not considered in the analysis at that time. Therefore, it is logical to speculate that in all the different reactors designs (UASB, EGSB, IC, solid digesters, etc.) that are operated in a varied range of conditions and treating different substrate compositions (solid or liquid wastes, high or low OLRs), there will be present not only different microbial communities but also different methanogenic communities structures, as a response to the environmental pressures.

Methanogens are the key microbial population in anaerobic technologies still there is no clear estimation of which percentage they represent in the prokaryotic community. A study performed in 21 full-scale reactor found a broad ratio variation between 2-20% of the total microbial population (Sundberg *et al.*, 2013). Sometimes, the low abundance of the methanogens in the metagenome or the low coverage of primers sets, make genetic diversity analysis difficult when end-point PCR based approaches such as DGGE and other finger-printing techniques are used and their diversity is often under-represented. On the other hand, qPCR approach represents a suitable tool to work with low concentrations of the target gene and several specific set of primers, making this a reliable approach to analyse the structure of the methanogenic community on a phylogenetical basis.

Finally, to conclude about the major pathway contributing to methane

formation (hydrogenotrophic or acetoclastic), the methane production rate must be evaluated in addition to the genetic analysis. Hence, both aspects: number and activities must be weighted. Moreover, other factors such as, substrate concentrations (acetate, H₂, CO₂), the role of syntrophic acetate oxidizing bacteria (SAOB) kinetics constants and the presence of inhibitors must be taken into account.

2.4 Conclusions

This work showed the importance of the hydrogenotrophic methanogenesis in full-scale systems treating dairy wastewater. Both qPCR and activity tests revealed a high abundance of hydrogenotrophic methanogens. The communities present in the two full-scale reactors were dominated by *Methanobacteriales* (hydrogenotrophic) with lower proportion *Methanosarcinales* (mainly acetoclastic) and of *Methanomicrobiales* (also hydrogenotrophic). The clone libraries showed that the methanogens present in both reactors showed a high similarity with methanogenic strains (*Methanobacterium beijingense* and *Methanosaeta concilii*) due to a bias in the coverage of the primer set used. Probably the higher resistance to environmental changes selected this group of methanogens in reactors exposed to variations in the feeding composition and environmental conditions.

2.5 References

- Barber, R.D., Zhang,L., Harnack,M., Olson,M.V., Kaul,R.,Ingram-Smith,C. Smith,K.S. (2011). Complete Genome Sequence of *Methanosaeta concilii*, a Specialist in Acetodlastic Methanogenesis. *J Bacteriol*, 193(14), 3668-3669.
- Batstone, D.J., Keller, J., Steyer, J.P. (2006). A review of ADM1 extensions, applications and analysis: 2002-2005. *Water Sci Technol*, 54, 1-10.
- Bialek, K., Kumar, A., Mahony, T., Lens, P.N., O'Flaherty, V. (2012). Microbial community structure and dynamics in anaerobic fluidized-bed and granular sludge-bed reactors: influence of operational temperature and reactor configuration. *Microb Biotechnol*, 5(6), 738-52.
- Chao, A. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian J Statistics*, 265-270.
- Coates, J.D., Coughlin, M.F., Collieran, E. (1996). Simple method for measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludge. *J. Microbiol. Methods*, 26, 237-246.
- Cole, J.R., Q. Wang, J.A. Fish, B. Chai, D.M. McGarrell, Y. Sun, C.T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje (2014). Ribosomal Database Project data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res*, 42(Database issue):D633-D642
- DeLong, E. F. (1992). Archaea in coastal marine environments. *PNAS*, 89(12), 5685-5689.
- Demirel, B., & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, 7(2), 173-190.
- Garcia, J-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4), 205-226.
- Guo, W., Liu, C., Zou, S., Zhang, M. (2006). Progress in research and application of homoacetogen. *Chin J Appl Environ Bio*, 12, 874-877.
- Jang, H.M., Kim, J.H., Ha, J.H., Park, J.M. (2014). Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Bioresour Technol*, 165,174-82.
- Jeris, J.S., Mc Carthy, P.L. (1965). The bio- chemistry of methane fermentation using C14 tracers. *J Water Pollut Control Fed*, 37, 178-192.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Trably, E., Angelidaki. I. (2006). Acetate oxidation is the dominant methanogenic pathway from acetate in the absence of *Methanosaetaceae*. *Appl Environ Microbiol*. 72, 5138–5141.
- Laukenmann, S., Polag, D., Heuwinkel, H., Greule, M., Gronauer, A., Lelieveld, J., Keppler, F. (2010). Identification of methanogenic pathways in anaerobic digesters using stable carbon isotopes. *Eng Life Sci*, 10(6), 509–514.
- Lee, C., Kim, J., Hwang, K., O'Flaherty, V., Hwang, S. (2009). Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating

- different wastewaters. *Water Res*, 43, 157–165.
- Ma, K., Liu, X., Dong, X. (2005). *Methanobacterium beijingense* sp. nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55, (PT 1), 325-329.
- Molina, F., García, C., Roca, E., Lema, J.M. (2008). Characterization of anaerobic granular sludge developed in UASB reactors that treat ethanol, carbohydrates and hydrolyzed protein based wastewaters. *Water Sci Technol*, 57 (6), 837–842.
- Mori, K., Harayama, S. (2011). *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(P1), 138-143.
- Mori, K., Iino, T., Suzuki, K., Yamaguchi, K., Kamagata, Y. (2012). Acetoclastic and NaCl-requiring methanogen '*Methanosaeta pelagica*' sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment. *Appl Environ Microbiol*, 78(9), 3416-3423.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *JMB*, 302, 205-217.
- Passeggi, M., López, I., Borzacconi, L. (2009). Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge *Water Sci Technol*, 59(3), 501–506.
- Pinto, A. J., & Raskin, L. (2012). PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PloS one*, 7(8), e43093.
- Schloss, P.D., *et al.*, (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75(23), 7537-41.
- Schnurer, A., Zellner, G., Svensson, B.H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol Ecol*, 29, 249–261.
- Schnürer, A., Schink, B., Svensson, B. H., (1996). *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int J Syst Bacteriol*, 46, 1145–1152.
- Shannon, C.E., Weaver W. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical J*, 27, 379–423 and 623–656.
- Smith, P.H., Mah, R.A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Appl Microbiol*. 14, 368-371.
- Song, M., Shin, S.G., Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Biores Technol*, 101(1), 23-28.
- Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests: theoretical basis and experimental set up. *Water Res*, 27, 1361-1376.
- Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H., ... & Karlsson, A. (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol*, 85(3), 612-626.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30, 2725-2729.
- Westerholm, M., Roos, S., Schnüurer, A. (2010). *Syntrophaceticus schinkii* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from a mesophilic anaerobic filter. *FEMS Microbiol Lett* 309, 100–104.
- Westerholm, M., Roosand, S., Schnüurer, A. (2011). *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst Appl Microbiol*, 34, 260–266.
- Whitman, W.B., Boone, D.R., Koga, Y., Keswani, J. (2001). Taxonomy of methanogenic Archaea. In: Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 1. Springer, pp 211–294.
- Xia, Y., Wang, Y., Fang, H. H., Jin, T., Zhong, H., Zhang, T. (2014). Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. *Sci Rep*, 4, 6708.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioengineering*, 89, 670-679.

2.6 Supplementary material

Table 2S. 1 16S rRNA gene copy numbers per ng of DNA quantified by qPCR

Copies		<i>Metanosarcinales</i>			<i>Methanobacteriales</i>			<i>Methanomicrobiales</i>		
16S.ng DNA ⁻¹	MSL	MBT	MMB	MSL	MBT	MMB	MSL	MBT	MMB	
Ddays	Conc	conc	Conc	stdev	stdev	stdev	stdev	stdev	stdev	
1,D	1.76E+05	3.13E+05	4.28E+02	3.80E+03	1.08E+03	1.18E+02				
	4.14E+05	3.04E+05	3.30E+02	2.35E+04	8.58E+01	3.04E+01				
	1.55E+05	2.30E+05	2.60E+02	2.01E+04	2.92E+02	1.25E+01				
	4.17E+05	3.23E+05	5.85E+01	6.30E+03	3.80E+02	1.44E+00				
	9.26E+04	3.18E+05	2.19E+01	1.08E+04	4.15E+03	4.61E+00				
	2.39E+05	7.78E+05	4.80E+01	2.01E+04	2.63E+02	8.51E-01				
	1.15E+05	9.65E+05	1.03E+01	1.03E+04	1.17E+04	6.41E+00				
	2.30E+05	5.70E+05	1.11E+01	2.68E+04	5.06E+03	1.64E+00				
	1.90E+05	4.82E+05	1.03E+01	4.20E+04	5.49E+02	7.90E-01				
	1.57E+06	3.06E+05	9.11E+00	6.69E+03	5.21E+03	0.00E+00				
	3.22E+06	3.18E+05	6.02E+00	4.78E+04	8.82E+03	9.82E-02				
	2.41E+05	2.09E+05	5.99E+02	5.50E+05	1.60E+03	3.71E-01				
2,D	3.26E+05	4.52E+06	9.43E+01	1.41E+04	1.80E+04	4.53E+01				
	2.86E+05	2.93E+06	4.57E+02	3.19E+04	7.50E+03	5.76E+01				
	1.71E+06	2.73E+06	2.27E+03	1.90E+05	2.75E+03	3.40E+02				
	6.63E+05	1.98E+06	9.94E+02	7.80E+04	1.83E+03	2.06E+02				
	2.73E+05	1.91E+06	1.15E+02	1.45E+05	1.47E+03	8.11E+00				
	6.30E+05	1.54E+06	1.58E+03	1.69E+04	3.08E+03	3.71E+01				
	1.46E+05	1.27E+06	9.20E+01	1.69E+04	4.38E+01	3.51E+00				
	2.36E+05	1.88E+06	8.54E+02	1.86E+04	9.62E+02	3.73E+01				

CAPÍTULO 3

REACTOR DE EFLUENTE LÁCTEO: DINÁMICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DURANTE EL ARRANQUE DE UN REACTOR UASB INDUSTRIAL DE TRATAMIENTO DE EFLUENTE LÁCTEO

Resumen del capítulo 3

Los efluentes lácteos se caracterizan por un alto contenido en grasas y ácidos grasos de cadena larga que dificultan su tratamiento con la tecnología anaerobia. Algunos de los principales problemas que causan las grasas en estos sistemas son la baja velocidad de hidrólisis de los ácidos grasos de cadena larga y por otro lado, la flotación y pérdida de lodo del sistema. En este capítulo se monitoreó la comunidad microbiana presente en el lodo de un reactor UASB de 100m³ modificado especialmente para tratar efluente de una industria láctea nacional, desde su arranque y durante su operación por ocho meses. Para estudiar la comunidad microbiana se empleó un abordaje molecular que consistió en el análisis de secuencias de genes ribosomales y la cuantificación de copias de genes ribosomales y funcionales de arqueas, en muestras de lodos obtenidas a lo largo del tiempo. Tomando en cuenta el lodo con el cual se inoculó el reactor, se observó una disminución en la diversidad microbiana como consecuencia de la adaptación al efluente y a las condiciones de operación del reactor. Los grupos *Clostridia*, *Synergystia* y *Gammaproteobacteria* se volvieron dominantes cuando el reactor estuvo sometido a las mayores cargas alcanzadas. Un incremento accidental de pH dentro del reactor inhibió temporalmente la producción de biogás e impactó sobre la estructura de la comunidad de bacterias, no siendo tan evidente en la comunidad de arqueas. Luego de un período de recuperación, el reactor mejoró su performance y se observó un aumento en la diversidad de bacterias y en la actividad metanogénica específica. El arranque y la operación del reactor así como el monitoreo de los parámetros de funcionamiento fueron realizados por la Ing. Quim. Alfonsina Fernández como parte de su trabajo de tesis de Maestría en Ing. Quim. Los ensayos de actividad de degradación de sustrato graso (ADSGE) fueron realizados en conjunto con la Msc. Fernández. La secuenciación se realizó en la plataforma ion Torrent PMG del Instituto de investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), en donde se emplearon las muestras estudiadas en este capítulo para poner a punto la técnica. Los análisis de secuencia fueron realizados enteramente por la autora de esta tesis, a excepción de la cuantificación del gen *mcrA* que fue realizada por la Msc. Patricia Bovio. Los datos moleculares se vincularon a la historia de reactor, empleando la información de los parámetros de funcionamiento. Los principales resultados de este capítulo fueron presentados en modalidad oral en el Internacional World Congress on Anaerobic Digestion, Viña del Mar, Chile, en 2014.

Title: Anaerobic microbial community selection during the start-up period of a full-scale UASB reactor treating dairy wastewater

Running title: **Dairy wastewater UASB start-up: microbial selection**

Authors: C. Callejas,* A. Fernández *, Wenzel, J.**, Bovio, P.**, Sotelo, J.**, L. Borzacconi*and C.Etchebehere**

* Biotecnología de Procesos para el Ambiente (BIOPROA). Fac. de Ingeniería. Universidad de la República Uruguay.

** Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay

* Correspondence to: Cecilia Callejas. Biotecnología de Procesos para el Ambiente (BIOPROA). Fac. de Ingeniería, Universidad de la República. Address: Herrera y Reissig 565, 5th fl. Montevideo, Uruguay, 11300. Phone: +598 2711 0871 ext. 111; Fax: +598 2711 5446; e-mail: ceciliac@fing.edu.uy; website: <https://www.fing.edu.uy/node/24100>

Abstract

The major components in dairy wastewater are fats, proteins and carbohydrates. This effluent can cause problems of sludge flotation and toxicity/inhibition effects in anaerobic systems. In this work, we monitor the microbial community present in a 100 m³ modified UASB from a local dairy industry during its start-up phase. An intermittent feeding regime was performed to avoid biodegradation inhibition. Deep sequencing analysis of the V4 region from 16S rRNA gene was performed in sludge samples collected monthly, during a nine-month period. The specific methanogenic, lipolytic activities and the copy number of *mcrA* gene were also determined in the same samples. The reactor seed sludge (1300 kg) was taken from an anaerobic lagoon and showed to be a diverse consortium with different groups in relative low abundances. As the feeding started the diversity decreased and the bacterial community turned to be dominated only by three taxonomical groups *Clostridia*, *Synergystia* and *Gammaproteobacteria*. These results indicate that the effluent composition, the OLRs and the upflow velocities applied shaped the microbial community present in the seed sludge. An accidental pH increase inhibited the reactor's performance and affected the microbial community structure. After a recovering period, the microbial population regained diversity and methanogenic activity. However, due to the sludge loss, the reactor had to be re-seeded. In summary, the taxonomical structure of the microbial community was dynamic in time, responding to the environmental changes imposed by the operational mode. The intermittent start-up stimulated the hydrolytic activity.

Keywords

Dairy wastewater, UASB, full-scale, start-up, SMA activity, 16S rRNA gene sequencing, qPCR *mcrA* gene

3.1 Introduction

The dairy industry is one of the most relevant sectors in the food industry due to the global-scale consumption of its products. Furthermore, it generates a huge amount of wastewater due to the high volume of water used per unit of production. It was estimated that 0.2–10 L of waste are generated per liter of processed milk (Milani *et al.*, 2011). The effluent is typically classified as ‘high to mid-strength’, with high contents of organic matter, mainly proteins, lactose and fat (up to 80 g.L⁻¹). Their proportions are variable, depending on the process involved (milk, cheese, etc) (Karadag *et al.*, 2015a). Likewise, another characteristic of this effluent are transiently sharp increments in the organic carbon load and pH.

The up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors use the anaerobic digestion technology to treat different wastewaters, converting the organic compounds present in the effluent into biogas. They have been successfully used in the dairy industry since the development of this technology (Karadag *et al.*, 2015b). Currently, anaerobic reactors are used in small to mid-scale local industries in Uruguay. The main drawback addressed to those systems when treating dairy wastewater was their tendency to fat, oil and greases (FOG) accumulation and the long time required for hydrolysis. The (FOG) accumulation phenomenon causes the active biomass adhesion, flotation and washout. On the other hand, the toxic effect of the resulting free long chain fatty acids (LCFAs) has been extensively described (Alvez *et al.*, 2009, Vidal *et al.*, 2000).

The addition of hydrolytic enzymes or physicochemical hydrolytic pretreatments have been used as strategies to cope with this phenomenon (Cammara *et al.*, 2006). Passeggi *et al.*, (2009) have developed a system that consists of a modified UASB reactor with a scum extraction device and a lamellar settler to circumvent the FOG phenomenon. This modified design in conjunction with an intermittent feeding regime was used as a start-up strategy with the aim of adapting the seed sludge to a new effluent. This strategy was reported to stabilize a dairy full-scale UASB reactor performance and improved the biomass retention in the system (Passeggi *et al.*, 2012).

The anaerobic digestion biotechnology is ultimately relying on a concerted microbial community of Bacteria and Archaea that drive the biochemical transformations of complex organic compounds down the pathway, to biogas formation (Batstone *et al.*, 2002). In the first steps, several groups of Bacteria (hydrolytic, acidogenic and acetogenic bacteria) are involved in the degradation of polymers to volatile fatty acids (VFAs), CO₂ and H₂. In dairy wastewater treatment, FOG hydrolysis and beta-oxidation are usually the rate-limiting step in the overall pathway (Alves *et al.*, 2009). The syntrophs are a key group of specialist bacteria that catabolize a limited range of substrates and are directly involved in providing acetate, H₂ and CO₂ to the methanogens (Werner *et al.*, 2011). Therefore, all the products generated by the syntrophs are used by methanogenic Archaea, a phylogenetically diverse group of strictly anaerobic *Euryarchaeota* (Thauer *et al.*, 2008). All the methanogens belong to four different taxonomical orders. Furthermore, they can be classified according to the substrate utilization for methane production into CO₂ and H₂ or acetate and methyl compounds consumers (Alvarado *et al.*, 2014).

Until recently, the anaerobic digestion was studied as a black-box model. Since the beginning of the technology until last decade, methanogenic bioreactors were maintained essentially by observed relationships between performance and operational parameters. Thus, misunderstanding of the microbial communities present in the reactors led to the perception that anaerobic reactors were an unreliable or unstable biotechnology. Currently, the knowledge about the microbiological factors underlying the differences between reactors with good performance of those with an unstable performance is still a question to answer. However, research into microbial anaerobic processes is promising due to the development of new technologies (Batstone *et al.*, 2014).

During the last decade, the utilization of culture-independent approaches to study anaerobic reactors have revealed the different taxonomical groups involved in the sequential steps of the process with a high resolution. The microbial composition of the anaerobic digestion have been described using a meta-analysis approach (Nelson *et al.*, 2011) and DNA deep sequencing technologies (Werner *et al.*, 2011; Sundberg *et al.*, 2013). However, most of the studies that analyzed the microbial communities in full-scale reactors were done during stable operational conditions. On the other hand, the information of microbial succession during the start-up phase in full-scale reactors has been poorly described.

Furthermore, the knowledge about the dominant methanogenic pathway in full-scale reactors has remained elusive. An attempt to address this question has been the quantitative approach, using quantitative PCR (qPCR) (Yu *et al.*, 2005) and FISH (Sekiguchi *et al.*, 1999) techniques of the *16S rRNA* or *mcrA* genes (Traversi *et al.*, 2012). *mcrA* gene encodes the alpha subunit of the methyl coenzyme M reductase (MCR) and showed a high concurrence with *16S rRNA* gene (Springer *et al.*, 1995). All known genomes of the methanogenic archaea encode at least one copy of the *mcrBDCGA* operon. Therefore, the presence of this enzyme is a reliable indicator of methanogenesis (Luton *et al.*, 2002). qPCR is increasingly being applied to investigate microbial ecology questions that cannot be answered with other techniques such as clone libraries or even high-throughput DNA sequencing (Kim *et al.*, 2013a). Using this approach, Kim *et al.*, (2013b) found an absolute dominance of hydrogenotrophic methanogens in full-scale anaerobic sewage sludge digesters.

As mentioned above, the link between the microbial dynamics and the operational parameters in the different anaerobic systems is still a quite incomplete puzzle. It has been reported that the microbial structure in the anaerobic reactors is functionally redundant. This redundancy of different taxa may be shaped by factors such as the different reactor configurations used (UASB, EGSB, CSTR, etc.), the organic loading rate (OLR) applied, the sort of effluent treated, the operation temperature and the ammonia concentration, among others (Carballa *et al.*, 2015; De Vireze *et al.*, 2015). The microbial communities involved in anaerobic digestion are among the more diverse (in terms of taxonomy and function) in engineered environments. The *omic*-approach applied to these communities in conjunction with detailed reactor performance data is providing new powerful tools to understand and to manage the microbial-part of anaerobic digestion (Vanwonterghem *et al.*, 2014, Cabezas *et al.*, 2015).

In this work, we have studied the microbial community present in a modified UASB full-scale of a local dairy industry, over a 9 months period, during its start-up phase. We used a battery of molecular and specific methanogenic activity and lipolytic batch tests with the aim to reveal the succession of microbial groups during this period. The data generated contributes to the knowledge of a quite unexplored period in full-scale systems.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Full-scale UASB reactor description and sludge sampling

During 2012, a 100 m³ UASB reactor was started-up using an intermittent feeding strategy (three days feeding/ four days recess). Operational parameters were set as follows: an increasing OLR was applied from 1.5 to 5.6 kgCOD.m⁻³.d⁻¹. The reactor was seeded with 1300 kg VSS sludge from an anaerobic pond treating slaughterhouse wastewater. 2L sludge samples were collected monthly to specific methanogenic and lipolytic activities. Sludge blanket samples were collected by a sampling port, located at 1,0m from the bottom of the reactor. 50mL subsamples were stored at -20 °C until molecular analysis processing, during 2012.

3.2.2 Physicochemical properties and methanogenic activities

To monitor the reactor process, performance (%COD removal, %CH₄) and operational (VSS in the reactor, Sludge Volumetric Index SVI, flow rate) parameters were measured. On each fresh sludge sample: volatile suspended solids (VSS g.L⁻¹), and SVI. The specific methanogenic activity (SMA kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹) was assayed in batch tests using acetate as substrate, according to a protocol previously reported (Soto *et al.*, 1993). The specific substrate degradation activity (SFDA) was assayed in batch tests with a modified protocol using an emulsion of anhydrous milk fat (BUTTEROIL_CONAPROLE) as substrate. SFDA was expressed as kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹. Chemical oxygen demand (COD g.L⁻¹) was determined for every feeding cycle in reactor inlet and outlet (APHA, 1995).

3.2.3 DNA extraction, sequencing, and bioinformatics

Samples for DNA purification were thawed and centrifuged at 5,000 rpm during 10 min. 250 mg of centrifuged sludge was used to extract DNA using a commercial kit (ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™, USA). Amplicons for the V4 region of genomic DNA of the samples were obtained by PCR with the primers: 520f AYTGGGYDTAAAGNG and 802r TACNVGGGTATCTAATCC. Adapters and barcodes for Ion torrent sequencing were included in the primers oligomers following the strategy of Claesson *et al.* (2009). The

expected size PCR products were purified from 1.8% agarose gel electrophoresis using a commercial kit (ZR Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, USA). Sequencing of the 16S rRNA amplicon libraries was carried out on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) in the platform at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo). Analysis of the raw data was performed with the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software package (Caporaso *et al.*, 2010). Quality filtering of the reads consisted in minimum sequence length of 200pb and quality score $Q > 25$. Chimera checking was performed using USEARCH6.1 (Edgar, 2010), OTUs were created *de novo*, using 97% similarity criteria. Sequences were aligned by PyNAST algorithm (Caporaso *et al.*, 2010). Taxonomy assignment was performed using Uclast algorithm (Edgar, 2010) using curated 16S rRNA reference data set from Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006). Alpha and Beta diversity were performed with QIIME package tools (weighted UniFrac). Samples were named in days, according to the seeding day, set as day 0.

3.2.4 Quantitative PCR

Quantification of the *mcrA* gene were performed using the nonspecific fluorophore SYBR green I (Molecular Probes, Invitrogen), with primers *mcrA-F* (TTCGGTGGATCDCARAGRGC) and *mcrA-R* (GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC) (Denman *et al.*, 2007), in a Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Standard amplification curves were constructed, using PCR products of a *mcrA* gene fragment (Luton *et al.*, 2002). DNA concentrations were determined using a Qubit® fluorometer. For each standard curve, a 10-fold serial dilution from 10^{10} to 10^6 copies. μl^{-1} was generated. Each PCR reaction was in a total volume of 15 μl using 10 μM of each primers and probe 5 μL of template DNA (1:10 dilution) was used per reaction, each sample including standards were analyzed in duplicates. The efficiencies of the real time PCR assays ranged from 100% to 103%, and the R^2 value for each standard curve lines exceeded 0.98.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Performance during intermittent start-up

The dairy wastewater included the wastewater from milk-tanks washing, milk pipelines and residual milk in the pipelines, as well. The reactor history was analyzed in three periods: *period 1) transient state* (days 1 to 84) The seeding sludge used as inoculum was collected from an anaerobic slaughterhouse wastewater anaerobic lagoon because it had a SMA of $0.16 \text{ kg COD.kgVSS}^{-1}\text{d}^{-1}$, previously determined in our lab. Moreover, the lagoon selected was located near to the dairy plant, in order to reduce the transport costs of the sludge (20 m^3). Another characteristic selected was the adapted biomass to high proteins and fats concentrations (often present in slaughterhouse wastewater). The feeding regime during this period was intermittent, 3 days of feeding and 4 days of recess. The reactor was started with a flow rate of $1.3 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ ($\text{OLR} = 0.12 \text{ kgCOD.kgVSS}^{-1}\text{d}^{-1}$) of wastewater. Load increases were made by increasing the flow rate until $6.0 \text{ m}^3.\text{h}^{-1}$ ($\text{OLR} = 1.44 \text{ kg COD.kgVS}^{-1}\text{d}^{-1}$); *period 2) NaOH discharge*, (days 84 to 189) the system was perturbed with an accidental NaOH discharge (between day 92 and 94) from the washing of the pipelines, while the industry was in a maintenance stop. Two factors summed up during period 2, the first was a combination of low OLR in the wastewater due to the stop in the production line and the accidental NaOH discharge to the reactor. The pH in the reactor increased from 7 to 9 during a couple of days and the low OLR could not produce enough VFAs to compensate that increase in the pH. The second factor was an unexpected deviation of sludge biomass through a recirculation system (pipelines and pump) of the reactor, causing granule disintegration and biomass loss in the effluent. Due to the biomass loss (sludge disintegration) and decrease in the SMA (NaOH discharge), the reactor OLR ($0.19 \text{ kg COD.kgVSS}^{-1}\text{d}^{-1}$) was considerably lower after the maintenance stop and 3) *Re-inoculation* (day 252) of the reactor with sludge from the same anaerobic lagoon. The reactor was re-inoculated due to a significant sludge loss.

In spite of the operational drawbacks, the reactor could recover its performance over time. The inoculum and the operation strategy chosen during the start-up period analyzed resulted in a good reactor performance, in terms of biogas produced and organic COD removal. On average, a COD removal efficiency $> 85\%$ (with exception of some days in period 2, that dropped to 55%) was estimated. This is important to support the idea (Passeggi, *et al.*, 2012) that dairy wastewater is feasible to treat with this biotechnology, at

a full-scale.

Table 3. 1. Reactor performance data and number of OTUs during the time analyzed.

(* calculated per feeding period of 3 days, (†) calculated on the date, (*n.d.*), no data, (-), not determined

<i>Days</i>	<i>Sludge[†] (kg)</i>	<i>N°OTUs[†] (97%)</i>	<i>OLR* (kgCOD.m⁻³ d⁻¹)</i>	<i>SLR* (kgCOD.kgVSS⁻¹ d⁻¹)</i>	<i>V CH₄* (m³)</i>	<i>% COD removal*</i>
21	1062	426	1.64	0.16	68	93
28	1024	336	2.7	0.27	159	97
42	875	218	4.6	0.52	-	91
84	378	125	5.6	1.48	196	93
119	377	114	0.75	0.20	-	63
147	296	122	2.28	0.77	88	83
189	303	308	2.51	0.83	119	<i>n.d</i>
252	995	432	-	-	-	-

3.3.2 Microbial structure and dynamics

A set of eight different sludge samples (days 0, 28, 42, 84, 119, 147, 189, 252) was analyzed. After sequence filtering, in order to compare the different samples, a subset of 18,000 sequences from each sample was used to perform the diversity analysis and taxonomy assignments. The primers used, spanning the V4 region, had a low coverage of the methanogenic Archaea present in all the samples and will not be discussed in this section. A total of 586 OTUs were obtained (L6), using a 97% similarity cutoff. However, only 64 OTUs were present in abundances higher than 1%. Rarefaction curves and alpha diversity matrix were estimated (data not shown).

When beta diversity analysis was performed (PCoA), using all the OTUs, a time-scale profile was observed (Figure 3.1). The samples ordinated along the principal coordinate one according to time and on principal coordinate two, according to diversity. As shown in the figure 3.1, both samples corresponding to the inoculation and re-inoculation grouped together, being the most diverse samples. The other samples clustered in two groups, before (days 28, 42 and 84) and after (days 119, 147 and 189) the pH perturbation (NaOH). According to principal component two, the dates analyzed before the pH perturbation were more diverse in terms of OTUs than after the perturbation. The taxonomical classification presented further supported these results.

The highest diversity of OTUs with abundances less than 1% were observed in the samples corresponding to the inoculum (days 0 and 252), those OTUs accounted for approximately 25% of the sequences. In the other samples analyzed (days 28, 42, 84, 119, 147 and 189) the OTUs with more than 1% abundance represented a range between 63% - 86% of the sequences on each sample.

The taxonomy assignment of the bacterial composition was analyzed according to the three periods of the reactor history: *Period 1*: During the seeding (inoculation) (day 0), the community showed to have the higher diversity with a total number of 426 OTUs, most of them in low abundances. The OTUs were classified within six different phyla; *can. phyl. Hyd24-12* (8%), *Synergistetes* (7.5%), *Proteobacteria* (8%), *Verrucomicrobia* (11%), *Firmicutes* (19%) and *Chloroflexi* (19%). As the intermittent feeding started (samples from days 28 and 42) the diversity decreased and on day 84, the bacterial community turned to be dominated only by members of three phyla: *Firmicutes* (class *Clostridia*, 29%), *Synergistetes* (class *Synergistia* 35%) and *Proteobacteria* (class *Gamma proteobacteria* 31%) (Figure 3.2).

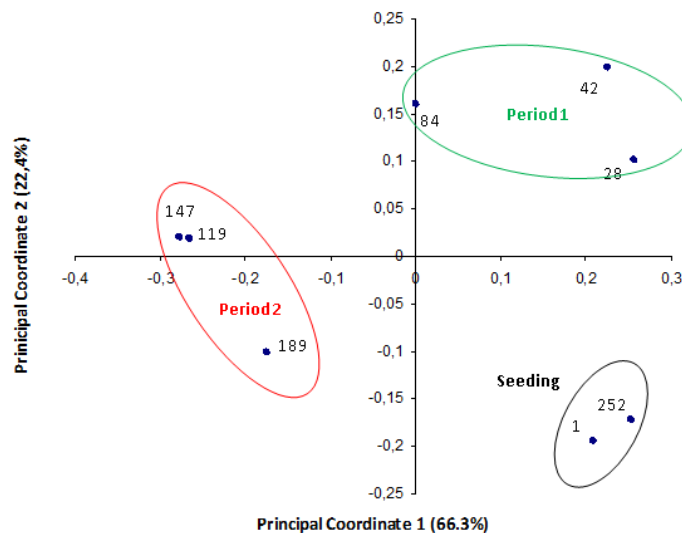


Figure 3. 1. UniFrac Principal Coordinate Analysis (PCoA) showing the similarities between samples, based on OTUs. Numbers represent sample dates in days.

The decrease in diversity occurred simultaneously to the OLR increase in the reactor.

As expected, the increase in OLR caused an increase in de methanogenic activity (SMA) (Table 3.2) and lipolytic activity (SFDA). The results showed that the effluent composition, the OLR and the upflow velocities applied shaped the microbial community present in the inoculum, which was in an *adaptation period*. Therefore, the microbial community responded with a decrease in its diversity, selecting those groups able to survive in the new environmental conditions. Moreover, *Synergistetes* and *Clostridia* classes contain numerous members involved in complex organic matter degradation, including H₂ and CO₂ producers that ferment lactic acid or acetic acid (Ito *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2011; Witheley *et al.*, 2012).

Among the minor phyla, *cand. phyl. WS3* phylum was notably abundant in the inoculum (16%) but reduced drastically its abundance, once the reactor had begun to be fed (0.8%). *WS3* is a phylum with no culturable representatives that has been recently renamed as *cand. phyl. "Latescibacteria"* (Rinke *et al.*, 2013). This group is ubiquitous in many anaerobic environments and is often present in anaerobic reactors. Recently, using the single cell technique in conjunction with *In Silico* genome analysis some of its metabolic potential and niche specialization were predicted (Youssef *et al.*, 2015). The authors postulated that *cand. phyl. Latescibacteria* members would have extensive saccharolytic and proteolytic capabilities. This would explain its high abundance in a slaughterhouse wastewatwer lagoon. Due to its large genome size and a single rRNA operon, a slow growth rate was also predicted. This could explain their decrease in abundance when the reactor started to be operated and lower sludge retention times (SRT) were applied.

The *Synergistetes* is a recently recognized phylum (Jumas-Bilak *et al.*, 2009) that have been described to be present in anaerobic reactors. Previously, several members of this group were misclassified as *Syntrophomononas* or other members of the *Firmicutes* phylum (Bahandari & Gupta, 2012). Some species have been identified as hydrogen producers. One principal metabolic feature of *Synergistetes* is their ability to degrade amino acids, peptides, and proteins while being mostly asaccharolytic (Jumas-Bilak & Marchandin, 2014). Thus, the dominance of this class in the community suggests that members of the *Synergistetes* were involved in amino acid degradation derived from protein hydrolysis (Milton *et al.*, 2015).

On the other hand, *Synergistetes* has been proposed to be syntrophs of

hydrogenotrophic methanogens (Ito *et al.*, 2011), suggesting that hydrogenotrophic methanogenesis could have an important contribution in the biogas generated in the reactor. These results were consistent with a previous work (data not shown) performed in the same sludge samples in which it was found by qPCR, that the hydrogenotrophic order *Methanobacteriales* was dominant in the reactor.

Period 2: After the NaOH pulse and subsequent increase in pH to 9 in the reactor, the methanogenic activity decreased drastically from 0.38 kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ in day 84 to 0.1 kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ in day 119 as determined in SMA batch tests (Table 3.2). The diversity in terms of taxonomical groups was maintained but a markedly increase in the abundance of the class *Clostridia* was observed, from 29% on day 84 to 70% on day 119. This might be explained by the fact that many *Clostridia* members are spore-forming bacteria, making this group more resistant to cell lysis caused by the pH change. During the next months of operation (days 147 and 189) the flow rate was gradually increased from 2.0 to 4.0 m³.h⁻¹ and the reactor started to increase its diversity and methanogenic activity from 0.1 kgCOD.kgVSS⁻¹ on day 119 to 0.26 kgCOD.kgVSS⁻¹ on day 189 (Table 3.2). On the other hand, the lipolytic activity (SFDA) was not affected by the pH change, the activity increased from 0.03 kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ on day 28 to 0.07 kg COD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ on day 84 (*period 1*) to 0.16 COD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ on day 147 (*period 2*).

The lipolytic activity (SFDA) correlated to an increase in *Clostridia* class abundance, suggesting that they could be involved in the lipolytic activity in the reactor. Several species of *Clostridia* have been reported to be the hydrolytic and fermentative members into the anaerobic consortium (Christy *et al.*, 2014). However, only a few OTUs were classified as *Syntrophomonas*, a well known LCFA degrading bacteria (deSouza *et al.*, 2008). Their low abundance could not explain the lipolytic activity in the reactor. Hence, an alternative group of *Clostridia* rather than *Syntrophomonas* would be involved in lipolytic activity by means functional redundancy. In the period when the *Clostridiales* became dominant (after the NaOH pulse) the most abundant OTU could not be classified and remained unassigned. The closest relative of this sequence had a 90% of identity with *Acetobacterium tundrae* strain Z4493 (NR_028934.1), when BLAST was performed. This result, suggests that the dominant OTU within the *Clostridiales* was an endemic strain. Unfortunately, 16S rRNA analysis limitations hindered the identification of this key OTU and any speculation about its metabolic function could not go furth

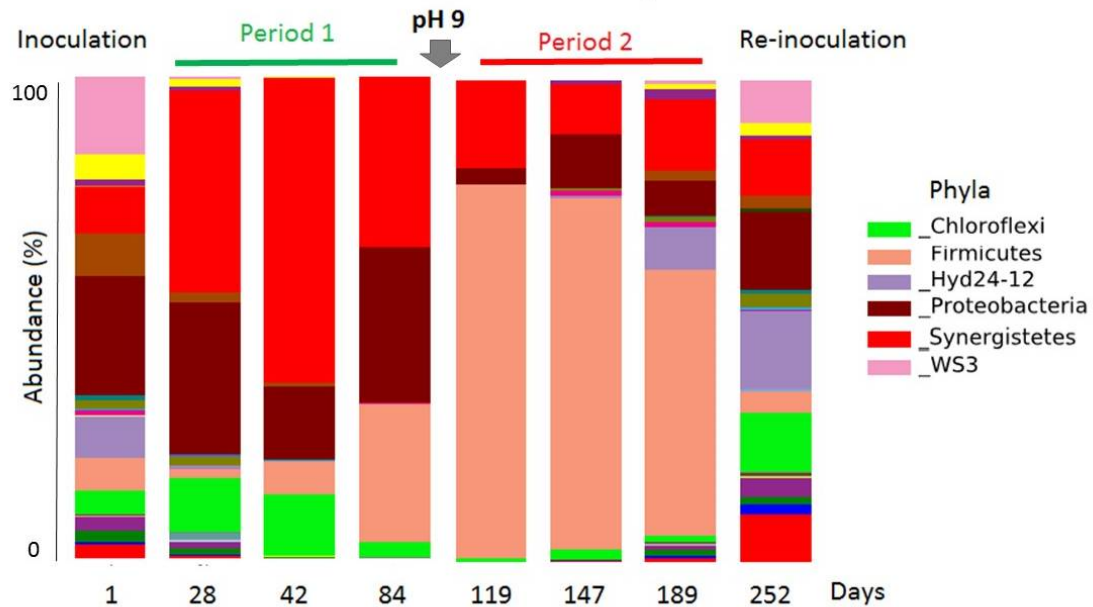


Figure 3. 2. Bar charts representing the relative abundance of the different phyla (%) in each sample according to 16S rRNA gene classification of every representative OTU. Color code of the dominant phyla are shown in the right.

Period 3: The sludge sample corresponding to the re-seeding of the reactor (day 252) showed a taxonomical structure resembling that one present in the first seeding (day 0). Both seed sludge were collected from the same slaughterhouse wastewater pond, with approximately 10 months difference. The similarity between both samples indicated some level of stability of the microbial community present in the lagoon during the time elapsed. This observation also reflects the differences in the dynamics of the microbial populations in both systems, namely, anaerobic lagoon and UASB reactor. Indeed, these two systems have very different operational parameters. Again, the upflow velocities, the lower HRTs and higher OLRs in the reactor imposed a selective pressure over the microbial community in the seed sludge (lagoon) that changed it to a new structure. Such a change was observed and discussed in the first period of this study.

All the major phyla identified in this work have been previously described in different anaerobic reactors. Nelson *et al.*, (2011) analyzed roughly 18.000 sequences of 16S rRNA gene retrieved from public databases reported in anaerobic systems, regardless of the reactor design or the effluent treated the authors found that bacteria could be classified within four 'major' phyla: *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, while

Synergistetes, *Planctomycetes*, and *Actinobacteria* were classified as minor phyla. On the other hand, Werner *et al.* (2011) studied the relationships of bacterial structure with function and environment in 112 samples from nine brewery wastewater reactors. The authors reported that *Bacteroidetes*, *Syntrophobacterales*, *Desulfuromonadales*, *Spirochaetes*, and small subsets of *Synergistia*, *Clostridia*, and *Chloroflexi* were the dominant OTUs in all the samples.

Another study reported by Sundberg *et al.* (2013) analyzed 21 full-scale reactors digesting sewage sludge or co-digesting wastes from slaughterhouses, restaurants or households. The authors showed that *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, and *Spirochetes* were dominant in the sewage sludge reactors while the *Firmicutes* were dominant in the co-digestion reactors. In this work, we found that *Firmicutes*, *Synergistetes* and *Proteobacteria* were the dominant phyla. The question about which phyla can be selected in the different reactors is far from reaching any robust answer.

Werner (2011) suggested that the resilience rather than competition would be the key factor to maintain the syntrophs (*Syntrophobacterales* and *Synergistia*) in the reactors. The authors also found stronger correlations between community structure and its function than its environment. Therefore, studies describing the taxonomic diversity present in the different anaerobic systems are helping to build a robust microbial pattern. From a functional standpoint, microbial community composition can change in response to any disturbance, using three basic mechanisms: resistance, resilience and redundancy (Allison & Martiny, 2008).

Resistant populations withstand changes, while resilient populations rebound after disturbance. The 'core microbiome' contains the resistant populations that can be used as a fingerprint of specific environments. On the other hand, syntrophic communities tend to be resilient. Syntrophic bacteria are often specialized organisms in low abundances and their persistence in the microbiome is crucial for overall performance (Carballa *et al.*, 2015). In this case, the major representative within syntrophs were *Synergistetes*. They could be involved in syntrophic acetate oxidation and amino acid degradation derived from proteins. The high protein content in this sort of effluent would explain their increase in abundance during the period 1. In addition, the pH increase affected drastically the group, which was able to persist in lower abundances anyways.

On the other hand, redundant populations are replaced by new populations whose function is analog to the original ones. Hydrolytic-fermentative bacteria are functionally redundant (Carballa *et al.*, 2015). In this work, *Clostridiales* were likely to be involved in hydrolysis of proteins and LCFAs in the wastewater. Unlike *Synergistetes*, they were a redundant diverse population since different OTUs were replaced constantly over time. They were classified in 23 different OTUs that varied their abundances over time (data not shown). Moreover, *Clostridiales* was also one of the dominant groups that seemed to not be affected, resisting the pH increase. In this regard, *Clostridiales* could be part of the 'core microbiome' since they were both, redundant and resistant.

3.3.4 Monitoring methanogenic community by *mcrA* gene quantification

The whole methanogenic community was monitored by quantitative PCR of the *mcrA* gene, which encodes for the metil coenzyme-M reductase. This enzyme catalyzes the reduction of CH₃-CoM to CH₄, the last catalytic step of methanogenesis. *mcrA* gene has a strong phylogenetic correspondence with the methanogenic 16S *rRNA* gene, with the advantage that is present in one single copy per genome. This approach avoids the copy number variation of 16S *rRNA* gene. As shown in figure 3.3 and table 3.2 the gene copy number was in a range between 8.4 x10⁵ to 1.1x10⁹ copies.ng⁻¹DNA⁻¹.

Table 3. 2. Specific methanogenic activities (SMA), copies of *mcrA* gene. ngDNA⁻¹ and total number of OTUs. (*n.d.*), no data

Days	SMA (kgDQO.kgSSV ⁻¹ d ⁻¹)	SD	<i>mcrA</i> (copies.ng DNA ⁻¹)	SD	N°OTUs (97%)
1	0.22	0.02	1.27x10 ⁷	3.55x10 ⁶	426
28	0.26	0.06	1.15x10 ⁷	8.82x10 ⁶	336
42	0.27	0.05	1.03x10 ⁸	1.98x10 ⁷	218
84	0.38	0.05	1.14x10 ⁹	1.78x10 ⁸	125
119	0.10	0.00	4.00x10 ⁶	3.86x10 ⁴	114
147	0.21	0.01	8.45x10 ⁵	1.04x10 ⁵	122
189	0.26	0.01	nd	Nd	308
252	0.26	0.06	9.52x10 ⁷	1.07x10 ⁷	432

On day 0, which corresponded to the reactor seed sludge, 2.3x10⁷ copies.ng DNA⁻¹ were determined. Then, an initial increase in the copy number of *mcrA* gene was observed during the *period 1*. The amount of copies increased until 1.1x10⁹ copies.ng DNA⁻¹ on day 84, before the NaOH discharge. This corresponded to the maximum specific methanogenic activity reached in the reactor (0.38 gCOD.gVSS⁻¹d⁻¹, determined by batch assays) (Table

3.2, Figure 3.3).

On day 119, the copy number dropped three orders of magnitude to 4.0×10^6 reproducing the inhibition of the methanogenic activity ($0.1 \text{ gCOD.gVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) caused by the sharp increase in pH. During *period 2*, on days 147 the copy number was even lower, $8.45 \times 10^5 \text{ copies.ng DNA}^{-1}$ but the SMA started to recover gradually ($0.2 \text{ gCOD-gVSS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Methanogenesis is more susceptible to stress and instability (Carballa *et al.*, 2015)

Therefore, two factors involving a combined effect could explain these results, a real biomass loss due to the disintegration of the sludge and on the other hand, the activity recovery of the pH inhibition over time. Indeed, due to the biomass loss, on day 252, the reactor had lost roughly $\frac{2}{3}$ of its sludge volume (Table 3.1) and had to be re-inoculated. The *mcrA* copy number content in the re-seeding (9 month later) sample was in the same order ($9.5 \times 10^7 \text{ copies.ng DNA}^{-1}$) than the first sample ($2.3 \times 10^7 \text{ copies.ng DNA}^{-1}$), suggesting a relatively stable methanogenic community in the anaerobic lagoon. The results were expressed per ng of total DNA instead of being normalized by VSS. The reason is that the VSS measure all the organic material, including recalcitrant molecules and does not reflect the biomass as well as the nucleic acid content (Morris *et al.*, 2014).

The SMA correlated to the *mcrA* gene copy number with a Pearson correlation coefficient 0.76 ($p\text{-value} < 0.05$). This correlation suggests that the quantitative approach could be more accurate to analyze the methanogenic population in anaerobic sludge samples than the 16S rRNA sequence based analysis. These results are in accordance with previous lab scale studies (Traversi *et al.*, 2012, Morris *et al.*, 2014) in which the authors suggest the qPCR as a fast method to monitor anaerobic biomass in reactors. The results showed in this work are from a full-scale system and confirm those obtained at lab-scale mentioned below.

In this work, the methanogenic community was able to adapt and increase its biomass during the intermittent start-up feeding and responded to the increase in the OLR. However, after the incidental pH increase and sludge grinding -due to sludge deviation to a

recirculation pump- that caused an important biomass loss, the reactor had to be re-inoculated.

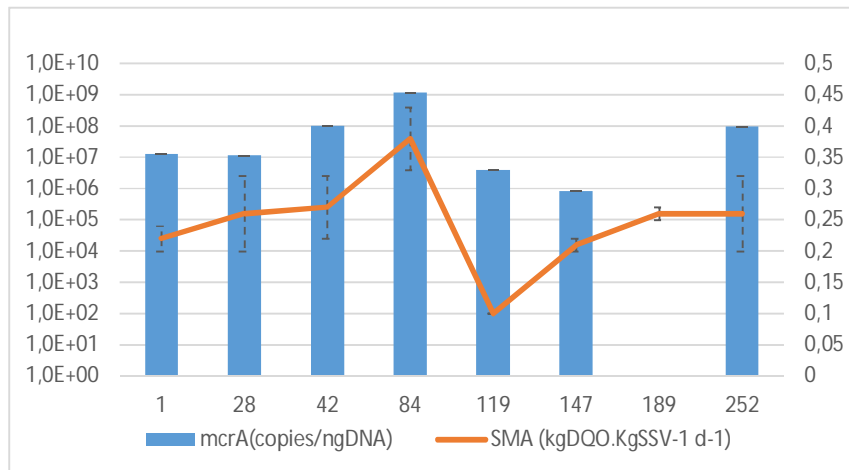


Figure 3.3. *mcrA* gene copies.ngDNA⁻¹ (bars) and specific methanogenic activity (SMA) tests (solid line) in different sludge samples.

3.4 CONCLUSIONS

The taxonomical structure of the microbial community showed to be versatile, responding to the operational changes by selecting *Synergistetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* phyla as the major bacterial players in the reactor.

Clostridiales were resistant after a pH perturbation and overgrew probably due to its ability to survive in harsh conditions and the redundancy of its members (OTUs). *Synergistetes* were resilient, showing some susceptibility after the perturbation but with the ability to persist in the microbiome. Finally, methanogens were negatively affected by the perturbation, being a population both resilient and resistant.

During the first operation month (transient period), the reactor showed to be highly dynamic in terms of microbial taxons. On the other hand, the microbial selection showed to be dependent on the effluent composition. The use of a diverse seed sludge was advantageous in the microbial selection.

The operation strategy stimulated the lipolytic activity, allowing downstream degradation of long chain fatty acids. Dairy wastewater was successfully treated with this biotechnology.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the project grant ANII FSE 17. Cecilia Callejas. was founded by ANII (PhD thesis grant). We thank Magela Odriozola for the useful suggestions.

3.5 REFERENCES

- Allison, S. D., & Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS*, *105* (Supplement 1), 11512-11519.
- Alvarado, A., Montañez-Hernández, L. E., Palacio-Molina, S. L., Oropeza-Navarro, R., Luévanos-Escareño, M. P., Balagurusamy, N. (2014). Microbial trophic interactions and *mcrA* gene expression in monitoring of anaerobic digesters. *Front Microbiol*, *5*, 597.
- Alves, M.M., Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Cavaleiro, A.J., Picavet, M.A., Smidt, H., Stams, A.J.M. (2009). Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb Biotechnol*, *2*(5), 538-550.
- American Public Health Association (APHA) (1995). *Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater* (19th edition). Byrd Prepress Springfield, Washington.
- American Public Health Association, & American Water Works Association (1981). *Standard methods for the examination of water and wastewater: selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency*. American Public Health Association.
- Batstone, D.J., Viridis, B. (2014). The role of anaerobic digestion in the emerging energy economy. *Curr Opin Biotechnol*, *27*, 142-149.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S. V., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A., ... & Vavilin, V. A. (2002). The IWA Anaerobic Digestion Model No 1(ADM 1). *Water Sci Technol*, *45*(10), 65-73.
- Bhandari, V., Gupta, R. (2012). Molecular signatures for the phylum *Synergistetes* and some of its subclades. *Antonie van Leeuwenhoek*, *102*(4), 517-540.
- Cabezas, A., de Araujo, J. C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., ... & Etchebehere, C. (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, *14*(4), 555-593.
- Cammarota, M.C., Freire, D.M.G. (2006). A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Biores Technol*, *97*(17), 2195-2210.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, *7*(5), 335-336.
- Carballa, M., Regueiro, L., & Lema, J. M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr Opin Biotechnol*, *33*, 103-111.

- Christy, P.M., Gopinath, L. R., Divya, D. (2014). A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renew Sust Energ Rev*, 34, 167-173.
- Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., ... & O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS one*, 4(8), e6669.
- De Santis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., ... & Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*, 72(7), 5069-5072.
- De Sousa, D.Z., Pereira, M.A., Alves, J.I., Smidt, H., Stams, A.M., Alves, M.M. (2008). Anaerobic microbial LCFA degradation in bioreactors. *Water Sci Technol*, 57(3), 439-444.
- De Vrieze, J., Saunders, A.M., He, Y., Fang, J., Nielsen, P.H., Verstraete, W., Boon, N. (2015). Ammonia and temperature determine potential clustering in the anaerobic digestion microbiome. *Water Res*, 75, 312-323.
- Denman, S. E., Tomkins, N. W., & McSweeney, C. S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol*, 62(3), 313-322.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.
- Ito, T., Yoshiguchi, K., Ariesyady, H.D., Okabe, S. (2011). Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge. *ISME J*, 5(12), 1844-1856.
- Jumas-Bilak, E., Marchandin, H. (2014). The Phylum *Synergistetes*. In *The Prokaryotes* (pp. 931-954). Springer Berlin Heidelberg.
- Jumas-Bilak, E., Roudiere, L., Marchandin, H. (2009). Description of 'Synergistetes' phyl. nov. and emended description of the phylum 'Deferribacteres' and of the family Syntrophomonadaceae, phylum 'Firmicutes'. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(5), 1028-1035.
- Karadag, D., Köroğlu, O.E., Ozkaya, B., Cakmakci, M. (2015)a. A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater. *Process Biochem*, 50(2), 262-271.
- Karadag, D., Koroglu, O.E., Ozkaya, B., Cakmakci, M., Heaven, S., Banks, C., Serna-Maza, A. (2015)b. Anaerobic granular reactors for the treatment of dairy wastewater: A review. *Int J Dairy Technol*, 68(4), 459-470.
- Kim, J., Lim, J., Lee, C. (2013a). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*, 31(8), 1358-1373.
- Kim, J., Kim, W., Lee, C. (2013b). Absolute dominance of hydrogenotrophic methanogens in full-scale anaerobic sewage sludge digesters. *J Environ Sci*, 25(11), 2272-2280.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148(11), 3521-3530.

- Milani, F.X., Nutter, D., Thoma, G. (2011). Invited review: Environmental impacts of dairy processing and products: A review. *J Dairy Sci*, 94(9), 4243-4254.
- Milton, C., Hamdi, O., Michotey, V., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Bouallagui, H., ... Bonin, P. (2015). Ecological significance of Synergistetes in the biological treatment of tuna cooking wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor. *Environ Sci Pollut Res*, 22(22), 18230-18238.
- Morris, R., Schauer-Gimenez, A., Bhattad, U., Kearney, C., Struble, C.A., Zitomer, D., Maki, J.S. (2014). Methyl coenzyme M reductase (mcrA) gene abundance correlates with activity measurements of methanogenic H₂/CO₂-enriched anaerobic biomass. *Microb Biotechnol*, 7(1), 77-84.
- 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.
- Passeggi, M., López, I., Borzacconi, L. (2012). Modified UASB reactor for dairy industry wastewater: performance indicators and comparison with the traditional approach. *J Cleaner Prod*, 26, 90-94.
- Passeggi, M., López, I., Borzacconi, L. (2009). Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge. *Water Sci Technol*, 59(3), 501-506.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.F., ... & Dodsworth, J.A. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499(7459), 431-437.
- Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi, A., Harada, H. (1999). Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl Environ Microbiol*, 65(3), 1280-1288.
- Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. (1993). Sodium inhibition and sulphate reduction in the anaerobic treatment of mussel processing wastewaters. *J Chem Technol Biotechnol*, 58(1), 1-7.
- Springer, E., Sachs, M.S., Woese, C.R., Boone, D.R. (1995). Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 45(3), 554-559.
- Sundberg, C., Al-Soud, W. A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S. S., Svensson, B. H., ... Karlsson, A. (2013). 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiol Ecol*, 85(3), 612-626.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Rev Microbiol*, 6(8), 579-591.
- Traversi, D., Villa, S., Lorenzi, E., Degan, R., Gilli, G. (2012). Application of a real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *J Environ Manag*, 111, 173-177.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Ho, D. P., Batstone, D.J., Tyson, G.W. (2014). Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. *Curr Opin Biotechnol*, 27, 55-64.
- Vidal, G., Carvalho, A., Mendez, R., Lema, J. M. (2000). Influence of the content in fats and proteins

- on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Biores Technol*, 74(3), 231-23.
- Whiteley, A. S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., ... & O'Donnell, A. (2012). Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal Microbiol Meth*, 91(1), 80-88.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T.A., Beers, A.R., Knight. R., Angenent, L.T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems *PNAS* 108, 4158–4163.
- Youssef, N. H., Farag, I. F., Rinke, C., Hallam, S.J., Woyke, T., Elshahed, M.S. (2015). In Silico Analysis of the Metabolic Potential and Niche Specialization of Candidate Phylum "Latescibacteria"(WS3). *PloS one*, 10(6), e0127499.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89(6), 670-679.

3.6 Supplementary material

Table 3S 1. Alpha diversity metrics. N° OTUs, Observed species, Phylogenetic distance (PD_tree) and Chao1 richness estimator.

Days	21	28	42	84	119	147	189	252
N° OTUs (97%)	1062	1024	875	378	377	296	303	995
Obs. Species	422	329	218	127	116	118	316	428
PD_tree	37,9	29,1	19,2	10,3	9,9	9,7	28,7	39
Chao 1	453	366	248	139	131	142	376	456

Figure 3S 1. Alpha diversity metrics plot

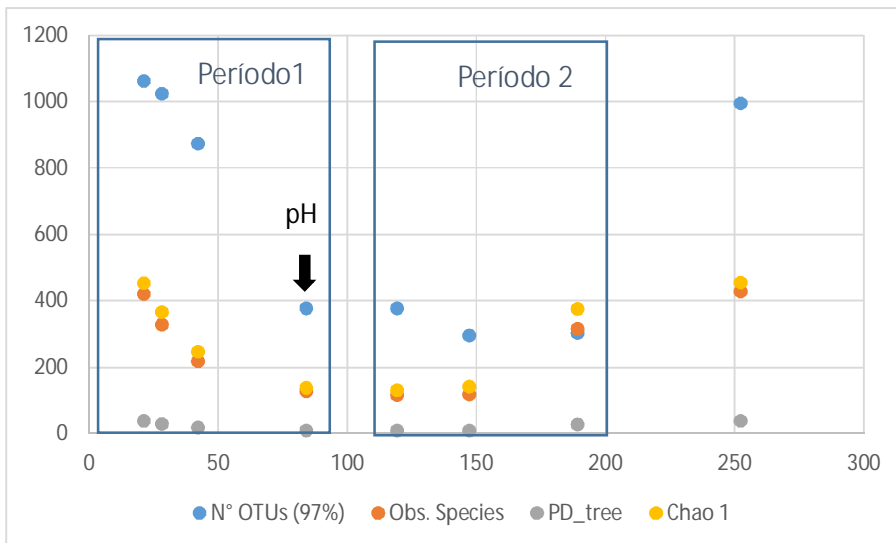
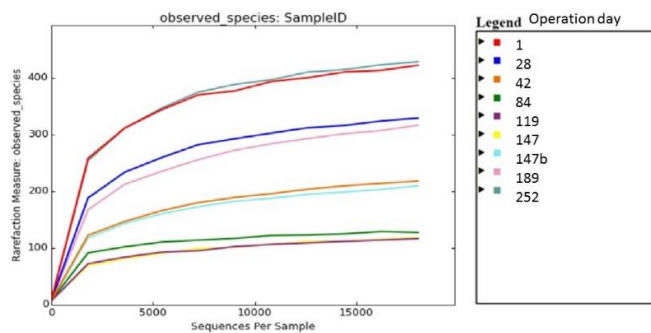


Figure 3S 2. Rarefaction curves, 97% similarity cutoff



CAPITULO 4

**REACTOR DE VINAZA: DINÁMICA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA
DURANTE EL ARRANQUE DE UN REACTOR UASB INDUSTRIAL PARA EL
TRATAMIENTO DE VINAZA**

Resumen capítulo 4

Desde 2009 ALUR-ANCAP produce biocombustibles con el objetivo de reducir la dependencia energética, combatir el cambio climático y generar empleo y desarrollo agroindustrial en el país. En 2007 se instaló una destilería de bioetanol a partir de caña de azúcar que tenía proyectada la producción de $120\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ de alcohol y $1800\text{m}^3\cdot\text{d}^{-1}$ de efluente o vinaza. En principio, la vinaza, se disponía en piletas anaerobias. Aunque, luego de un tiempo surgió el problema la generación de malos olores que afectaron a las poblaciones cercanas. Como solución a este problema se planteó el tratamiento de la vinaza generada con un reactor anaerobio UASB de 100m^3 , diseñado y operado por el grupo BIOPROA de la Fac. de Ingeniería. Debido a que la cosecha de la caña de azúcar se realiza una vez al año, el reactor operó de forma zafra, cuando se produjo el efluente. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del seguimiento de la comunidad microbiana presente en el lodo del reactor UASB, desde su arranque y durante dos zafras de operación. El último período interzafra también fue estudiado. Se colectaron nueve muestras de lodos y se analizaron mediante la secuenciación masiva de la región V4 del gen *rARN de 16S*, y la cuantificación de los genes *rARN de 16S* de arqueas y el gen *mcrA*. La comunidad de bacterias comenzó como una estructura caracterizada por una alta diversidad de taxones en bajas abundancias, que luego fue dominada por los filos *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* y el filo candidato *Hyd 12-24*. Las arqueas fueron dominadas por el orden *Methanobacteriales*, que representó a uno de los grupos metanogénicos exclusivamente hidrogenotrófico. La cantidad de sólidos dentro del reactor se correlacionó con la cantidad de copias del gen *mcrA*. La comunidad microbiana mostró ser robusta, con una gran cantidad de filos que persistieron en el reactor a pesar de los períodos interzafrales de parada. Todos los análisis fueron realizados enteramente por la autora de esta tesis, a excepción de la cuantificación del gen *mcrA* que fue realizada por la Msc. Patricia Bovio. Los principales resultados de este capítulo fueron presentados en modalidad oral, en el XII DAAL - Taller y Simposio Latino Americano en Digestión Anaerobia, en Cusco, Perú, 2016.

Title: Microbial Dynamics in a Methanogenic UASB Reactor Treating Sugarcane Vinasse During Start-up

Running title: **Vinasse UASB start-up: microbial selection**

Authors: C. Callejas,* I. López *, P. Bovio**, C. Etchebehere** and L. Borzacconi*

* Biotecnología de Procesos para el Ambiente (BIOPROA). Fac. de Ingeniería. Universidad de la República Uruguay (E-mail: ceciliac@fing.edu.uy, lborzacconi@fing.edu.uy)

** Laboratorio de Ecología Microbiana, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Uruguay (E-mail: cetchebehere@iibce.edu.uy)

* Correspondence to: Cecilia Callejas. Biotecnología de Procesos para el Ambiente (BIOPROA). Fac. de Ingeniería, Universidad de la República. Address: Herrera y Reissig 565, 5th fl. Montevideo, Uruguay, 11300. Phone: +598 2711 0871 ext. 111; Fax: +598 2711 5446; e-mail: ceciliac@fing.edu.uy; website: <https://www.fing.edu.uy/node/24100>

Abstract

Vinasse, also termed stillage, is the wastewater from ethanol distillation, after carbohydrates fermentation. In Latin America, sugarcane crop is an important sector in agro industry, due to its use in bioethanol production. The high COD present in the vinasse makes it attractive for anaerobic treatment and biogas production. However, the application of this technology in biorefinery still faces some challenges. The aim of this work was to understand the dynamics of the microbial community present in a 100m³ UASB reactor treating sugarcane vinasse. The reactor was operated to evaluate the performance under industrial conditions, from the start-up period and during two consecutive seasons. An inter-season period was also studied. Nine sludge samples were used to study the microbial composition and dynamics by *16S rRNA* gene massive sequencing analysis and *mcrA* gene quantification. The bacterial component was shaped by the wastewater treated. *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *candidate phyla Hyd 12-24*, became the dominant phyla. The methanogenic archaea were dominated by hydrogenotrophic *Methanobacteriales* order. The whole community showed to be robust and stable over time, probably due to the reactor configuration used. Long-term starvation did not affect the microbial structure.

Keywords

Vinasse, UASB, start-up, full-scale, *16S rRNA* gene, *mcrA* gene

4.1 Introduction

Vinasse, also termed as stillage, is the aqueous by-product of ethanol distillation, after carbohydrates fermentation. Ethanol can be produced from different feedstocks such as sugarcane, sugar beet, grape, agaves or sweet sorghum. It was estimated that 9 to 14L of wastewater are generated per litre of alcohol (Wilkie *et al.*, 2000). This acidic (pH 3.5–5) effluent is dark coloured, presents a strong odor and a high content of organic matter (COD 50–150 gL⁻¹) and minerals. Organic matter is often present as organic acids and phenolic compounds while minerals involve high potassium levels, heavy metals and sulfate compounds (España-Gamboa *et al.*, 2011). In addition, vinasses can contain melanoidines, cellulose and hemicellulose (Parnaudeau *et al.*, 2008).

In Latin America, sugarcane crop is an important sector in agroindustry. Brazil is the world's largest producer (FAO, 2013). In sugarcane vinasses, glycerol, lactic acid, ethanol and acetic acid are the major components of the organic matter (Parnaudeau *et al.*, 2008). Management and disposal of residues have become problematic due to the large volume generated and the potential environmental pollution caused by inadequate practices (Christofolletti *et al.*, 2013).

Since late 1970s, the traditional management of this effluent has been the fertirrigation, which is the addition of raw vinasse to the water used by the irrigation system in the crop field. However, due to the high concentration of organic matter, potassium and the large volume produced, concerns about the environmental impact of this practice has emerged (Christofolletti *et al.*, 2013). Alternative management practices such as recycling of vinasse in fermentation, concentration by evaporation, yeast production, energy production, or raw material for the production of livestock and poultry feed, have been suggested (Robertiello, 1982).

The high organic content of vinasses make them attractive to anaerobic technology treatment. In addition to organic matter removal, the production of energy in the form of biogas can be obtained. On the other hand, due to their high capacity, compact design and economic costs, upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors have been successfully used in several types of wastewater such as food processing and beverage industries, distilleries, pharmaceutical industries, pulp and paper mills (Lettinga *et al.*, 1984, van Lier *et*

al., 2015).

In spite of its promising biogas potential, full-scale industrial application of this technology to vinasses is not well established yet. Moreover, only 10% of the reactors installed in the alcohol distilleries use anaerobic technologies (van Lier, 2008). This may be the consequence of some characteristics of this type of effluent, *e.g.*: high inhibitory concentrations of potassium, presence of phenolic, polyphenolic compounds and melanoidins. The presence of those molecules inhibits microbial processes, hindering anaerobic digestion (Wilkie *et al.*, 2000, España-Gamboa *et al.*, 2011).

Research on anaerobic treatment of vinasses, as well as their composition, operational conditions, raw materials or reactor configuration has been reviewed (Wilkie *et al.*, 2000, España-Gamboa *et al.*, 2011). Regarding sugar cane vinasses, the literature is less reported. There are other bench-scale studies, sometimes with inconclusive results (Moraes *et al.*, 2015). None of the aforementioned studies has focused on the microbiology component of the reactors.

Only two studies reported the microbial community associated to lab-scale UASB reactors treating sugarcane vinasse. The first study conducted by España-Gamboa *et al.*, (2012) analysed the microbial community based on the presence-absence of specific 16S *rRNA* gene amplification products, using specific primers for key microbial groups. The authors detected specific PCR products of methanogenic *Methanobacteriales* and *Methanosarcinales* in the optimum organic loading rate. Moreover, bacterial representatives were Gram-positive bacteria with low GC content, (*Bacillus*, *Clostridium*, α and δ -Proteobacteria). Martínez *et al.*, (2014), used massive sequencing approach to study the microbial consortium growing on vinasse. They used pyrosequencing of the 16S *rRNA* gene and found *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* and *Thermotogae* to be the dominant phyla in a sludge sample.

In 2007, the Uruguayan government established a sugarcane-ethanol refinery, in order to reduce imported oil consumption and greenhouse emissions. The distillery was projected to have a capacity of 120 m³.d⁻¹ of alcohol and to produce 1800 m³.d⁻¹ of effluent (López, 2016). The ethanol production was seasonal. The distillery was in operation approximately over six months, during sugarcane harvest/crush and remained without

feeding during the next six months. The vinasse produced by the distillery was mainly treated by anaerobic lagoons. However, due to wastewater disposal problems and the high volume produced, an UASB reactor was installed in order to improve vinasse management.

The aim of this work was to understand the changes in the microbial community present in a methanogenic UASB reactor (100 m³), treating sugarcane vinasse produced by the ethanol distillery, since its start-up period. Nine sludge samples were analysed during two consecutive seasons and one inter-season period as well. To study the microbial composition and dynamics, 16S *rRNA* gene massive sequencing analysis, *mcrA* gene and 16S *rRNA* from methanogenic archaea quantification were performed.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Reactor operation and monitoring

A 100 m³ UASB reactor for the treatment of sugarcane vinasse of bio-ethanol industry located in Uruguay was designed and constructed in fiberglass reinforced plastic. The dimensions were 3.8 m of diameter and 9 m in height. Insulation was made by 5 cm of glass wool covered by a sheet of fiberglass reinforced plastic. The reactor start-up was in 2011, during mid-season of ethanol production. It was inoculated with a non-granular sludge from a slaughterhouse wastewater treatment lagoon, due to the lack of granular sludge in the nearby locations. The reactor was operated for 72 days until the end of the first season, followed by a stop period of 6 months. In 2012, the reactor was operated over 100 days, almost the entire season. A fixed volume of influent was fed daily to the reactor, with a mean hydraulic retention time (HRT) of 8.6 days. The influent concentration was adjusted by the dilution of raw vinasse with clean water, using raw vinasse content between 25-100%. As a result, the COD concentration at the inlet was in a range of 10 gCOD.L⁻¹ to 55 gCOD.L⁻¹. A mean specific organic load of 0.66 kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹ (volumetric load of 3.7 kgCOD.m⁻³.d⁻¹) was achieved with an average of 78% of COD removal (López *et al.*, 2016). Biogas production had 68% of methane content, which represented 94.5% of COD removed. Specific methanogenic activity (SMA kgCOD.kgVSS⁻¹.d⁻¹) of sludge samples were assayed in batch tests using acetate as substrate, according to a protocol previously reported (Soto *et al.*, 1993).

4.2.2 Sample collection DNA extraction and sequencing

Sludge-bed samples (2 L) were collected from the bottom sampling port and stored at 4°C until analysis. A subsample (10 mL) was centrifuged at 10³ rpm for 10 min and the pellet was stored at -20°C for genomic analysis. For each sample, 250 mg of sludge was used to extract DNA using a commercial kit (ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™, USA). Amplicons for the V4 region of genomic DNA of the samples were obtained by PCR with the primers: 520f AYTGGGYDTAAAGNG and 802r (TACNVGGGTATCTAATCC) designed by the RDPstaff (<http://pyro.cme.msu.edu/pyro/help.jsp>). Adapters and barcodes for Ion torrent sequencing were included in the primers oligomers following the strategy of Claesson *et al.* (2009). The expected size PCR products were purified from 1.8% agarose gel electrophoresis using a commercial kit (ZR Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, USA). Sequencing of the 16S rRNA amplicon libraries was carried out on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) in the platform at the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Montevideo).

4.2.3 Sequence analysis

Analysis of the raw data was performed with the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software package (Caporaso *et al.*, 2010). Quality filtering of the reads consisted in minimum sequence length of 200pb and quality score $q > 25$. USEARCH6.1 (Edgar, 2010) was used for chimera check of sequences. A batch of 29,000 sequences per sample were analysed. OTUs were created de novo, using 97% identity criteria. Rarefaction curves and alpha diversity were estimated. Beta diversity was analysed using weighted UniFrac distance. Taxonomic assignment to OTU representative sequences was performed using RDP database. The 20 most abundant OTUs representative sequences were selected manually and compared to public databases (NCBI) by BLAST. The selection criterion used was the ranked abundances of OTUs in day 356, when the operation of the second season finished.

4.2.4 Quantitative PCR (qPCR)

Quantification of the 16S rRNA gene of four methanogenic orders was performed

using hydrolysis probes and primers for (*Methanobacteriales* (MBT); *Methanomicrobiales* (MMB); *Methanococcales* (MCC) and *Methanosarcinales* (MSL) as described previously (Yu *et al.*, 2005). Each master mix was performed in a total volume of 20 μl using 10 mM of each primers and probe, following the manufacturer's instructions (Life Technologies, USA). 2 μl of template DNA (1:10 dilution) was used per reaction. Each sample including standards were analysed in duplicates. Quantification of the *mcrA* gene was performed using the nonspecific fluorophore SYBR green I (Molecular Probes, Invitrogen), with primers *mcrA*-F (TTCGGTGGATCDCARAGRGC) and *mcrA*-R (GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC) (Denman *et al.*, 2007), in a Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Standard amplification curves were constructed, using PCR products of a *mcrA* gene fragment. For each standard curve, a 10-fold serial dilution from 10^{10} to 10^6 copies μL^{-1} was generated. Each PCR reaction was in a total volume of 15 μL using 10 μM of each primers and probe 5 μL of template DNA (1:10 dilution) was used per reaction, each sample including standards were analysed in duplicates.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Microbial consortium present in the reactor

The reactor was operated seasonally, while ethanol and vinasse were produced. Microbial structure was analysed in nine samples, collected from the reactor sludge bed, during two successive harvests. Two samples (days 15 and 57) were collected during the first operation season and start-up operation, four samples were collected during the second harvest while the reactor was in the second operation season (days 271, 306, 334 and 356). Additionally, other three samples were collected while the reactor was in an inter-season stop, without feeding (days 383, 439 and 531).

Massive sequencing of *16S rRNA* gene of the nine samples was analysed. Raw data was curated by size and quality. A total number of 17,059 OTUs was estimated in 939,242 sequences. The batch of sequences was normalized to 29,000 per sample to perform the analysis. A number of OTUs between 1883 to 2332 were obtained (Table 1).

Table 4. 1. Performance data of the reactor. The number of OTUs obtained in the massive sequencing, organic loading rate (OLR), specific loading rate (SLR), specific methanogenic activity (SMA) and organic matter removal (%COD) are shown.

Periods	Sampling Days	OLR (kgCOD.m⁻³ d⁻¹)	SLR (kgCOD.m⁻³ d⁻¹)	%COD removal	SMA (kgCOD.m⁻³ d⁻¹)	#OTUs
1st year operation	15	3.34	0.77	49	0.08	2131
	57	1.11	0.28	56	0.11	2243
2nd year operation	271	1.21	0.68	44	0.08	2321
	306	<i>n.d</i> *	0.33	84	0.35	2113
	334	2.89	0.60	95	0.4	1883
	356	4.03	0.40	85	0.3	2010
2nd year stop	383	<i>n.f</i> *	<i>n.f</i>	-	0.21	2332
	439	<i>n.f</i>	<i>n.f</i>	-	0.13	2041
	531	<i>n.f</i>	<i>n.f</i>	-	0.1	2155

n.d (no data); *n.f* (no feeding)

Rarefaction curves and alpha diversity metrics were estimated. A decrease in diversity around day 334 was observed (Table 4S.1, Figure 4S.1). Beta diversity analysis (Figure 4.1) showed that sample from day 334 split the remaining samples in two major groups. The first cluster contained the samples collected during the start-up operation period and the beginning of the second operation period (days 15-306), while the second group was composed by the samples collected in the second operation period and inter-season stop (days 356-531). Moreover, a time ordination of the samples along the principal coordinate 2 was observed. These results showed that the microbial community had a similar phylogenetic composition and proportional abundances from the start up until day 334, when it changed to a different state. After day 334, the community moved to a new configuration of its structure and remained similar, even after 5 months since the reactor operation stop without feeding.

Furthermore, the clustering of the samples during the stop period suggests some phylogenetic stability of the microbial community while the reactor was not fed with the effluent (2nd operation stop). The effect of 'famine' over long periods in anaerobic reactor is a research question to answer. In this work, the beta-diversity results suggest that the bacterial consortium in the reactor was able to resist starvation for a period of at least five

months, without changing its phylogenetic structure. However, it is not possible to speculate whether the microorganisms remained constant in terms of number of cells or declined during this period due to the limitations of the approach.

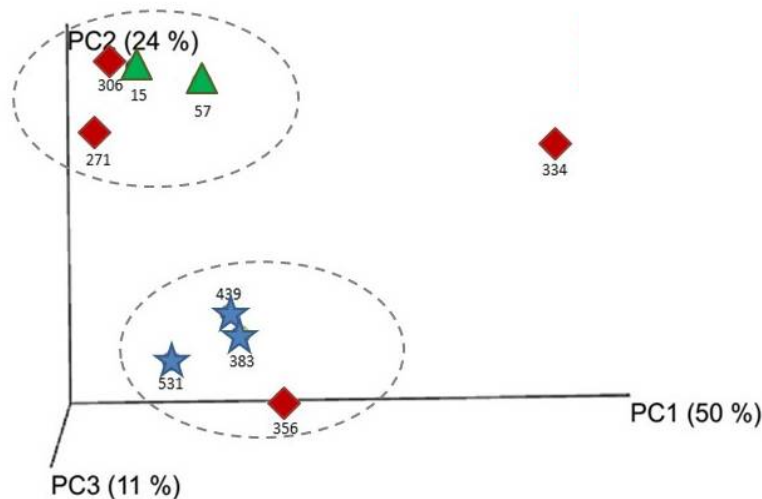


Figure 4. 1. Principal component analysis showing beta diversity calculated by UNIFRAC. Dates are tagged according to operation day. Green triangles represent 1st year operation, red diamonds 2nd year operation and blue stars 2nd year stop.

The analysis of the operational parameters monitored, such as OLR or HRT could not be linked to the results obtained in beta diversity analysis e.g. the perturbation that caused a diversity decrease in day 334, or the community shift after that day. Indeed, the understanding of which stochastic or deterministic effects govern the bacterial populations in methanogenic reactors remains elusive (Lucas *et al.*, 2015). In this work, we could not confirm the deterministic effect of substrate and operational conditions on microbial community assembly (Vanwonderghem *et al.*, 2014). However, we speculate that the high variations in the vinasse concentration, during different operational periods could have been the factor that might governed the changes in bacterial structure.

The taxonomic classification of OTU-representative sequences resulted in 473 groups at the genus level (L6), representing 54 Bacteria phyla and 2 Archaea phyla. Among *Euryarchaeota*, members of the orders *Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales* and

Methanosarcinales were identified. Although the primers used in this study were reported as ‘universal’ for prokaryotes, a bias to some archaeal groups was detected. The methanogenic profile obtained in the taxonomic classification of OTUs was different from that obtained by qPCR using specific primers for different methanogenic groups (Figure 4.2). Therefore, the methanogenic archaea will not be discussed in this section. Furthermore, an alternative set of specific primers designed for Archaea might be used to interrogate their diversity (Pinto *et al.*, 2012).

Dominant bacterial representatives (>1%) included members of *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Thermotogae* and *Verrucomicrobia* phyla, among others. Some unculturable *candidate phyla*, namely, OP8, Hyd24-12 and OD1 were also dominant (Table 4.2). With the exception of some *candidate phyla*, these bacterial groups resembled those reported by Martinez *et al.* (2014) in a lab scale UASB reactor treating sugarcane vinasse. Moreover, Nelson *et al.* (2011) classified *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes* as ‘major’ *phyla* in anaerobic reactors, because they are dominant in anaerobic reactors regardless of feeding material or reactor configuration. On the other hand, *Acidobacteria*, *Synergistetes*, *Thermotoga* and *Verrucomicrobia* were classified among the 24 minor *phyla* in the aforementioned study.

Recently, genome reconstruction from metagenomic studies have shed light in the distribution and metabolic capabilities of some candidate phyla present in anaerobic environments. For instance, *Hyd24-12* (Kirkegaard *et al.*, 2016), *OP8* (Farag *et al.*, 2014) and OD1 (Nelson & Stegen, 2015) groups were reported in several anaerobic environments, including mesophilic anaerobic reactors. Despite being classified by Nelson *et al.*, (2011) as a ‘minor’ group, *Verrucomicrobia* had significant higher abundances (6%) compared to those reported in the literature (0,1-1%) (Cabezas *et al.*, 2015). In addition, *Verrucomicrobia* was reported to be dominant (35%) in a lab-scale reactor treating vinasse as well (Martinez *et al.*, 2014). We speculate that this phylum might be characteristic in reactors treating this sort of effluents.

Minor groups (0.01>x>1%) were *Actinobacteria*, *Armatimonadetes*, *Chlamydiae*, *Chlorobi*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *BRC1*, *NC10*, *NKB19*, *OP11*, *OP3*, *OP9*, *WS1* and *WS3* phyla, among others (data not shown). Finally, the “rare biosphere” (<0.01%) present in the reactor was affiliated to *Elusimicrobia*, *FBP*, *FCPU426*,

Fibrobacteres, *Fusobacteria*, *GN02*, *GN04*, *GOUTA4*, *Gemmatimonadetes*, *KSB3*, *LD1*, *OP1*, *PAUC34f*, *SC4*, *SR1*, *TA06*, *TM6*, *Tenericutes*, *WPS-2*, *WS2*, *WS4*, *WS6*, *WWE1*, *ZB3* and *Thermi* phyla.

Table 4. 2. Selected ‘major’ phyla ($\geq 1\%$), showing the relative abundance values per date.

Phylum/Days	15	57	271	306	334	356	383	439	531	Mean (%)
<i>Acidobacteria</i>	1,9	1,2	2,7	1,3	0,4	1	1,5	1,8	1,7	1,5
<i>Bacteroidetes</i>	0,5	0,5	1,9	0,8	1,5	5,5	2,9	1,1	4,7	2,2
<i>Chloroflexi</i>	19	23	13	24	11	9,9	13	21	12	16,1
<i>Firmicutes</i>	19	17	14	21	26	56	52	49	48	33,5
<i>Hyd24-12</i>	8	10	17	5,6	1,3	7,1	6,5	1,3	2,6	6,7
<i>OD1</i>	0,2	0,4	0,4	0,3	1,8	0,8	1,6	1,8	3,5	1,2
<i>OP8</i>	3,2	3	6,3	4,6	0,6	1,8	3,6	2,1	2,9	3,1
<i>Proteobacteria</i>	8	8	14	6,6	2,2	3,1	4,2	4,9	5,5	6,3
<i>Synergistetes</i>	7,5	5	4,4	8,7	2,9	4,1	3,5	4,5	7,5	5,3
<i>Thermotogae</i>	3,3	3,4	5	1	0,1	0,3	0,5	0,4	0,6	1,6
<i>Verrucomicrobia</i>	11	14	3,2	2,2	46	6	4,8	5,7	3,7	6,2*

*average without day 334

This long ‘tail’ of low relative abundance OTUs is poorly understood in most microbial communities studies and their analysis is out of the scope of this work. Nevertheless, it is relevant to recall that rare taxa function as a ‘seed bank’ for eventual colonization when environmental conditions change. Indeed, they are important players in the ecological resilience of an environment and should not be removed in diversity analysis, e.g. OTU based analysis (Lynch & Neufeld, 2015).

Furthermore, a high percentage of candidate phyla in the ‘minor’ and ‘rare’ categories was observed. The total sum accounted for 12% (data not shown), showing their relevance in the whole microbial community. Since they have no cultured representatives, they were often neglected in the discussion of microbial ecology papers. Currently, bioinformatic tools can shed light on this uncultured diversity that have remained unexplored. Thus, more effort in the comprehension of their role in anaerobic digesters is necessary.

On the other hand, the dominant OTUs were explored by ranking their relative abundance, according to the last obtained operation date, before the reactor second stop (day 356). In Table 4.3, the 20 most abundant OTUs are presented. *Firmicutes* phylum was represented by 11 out of 20 OTUs, showing the relevance and redundancy of this group of

hydrolytic-fermentative bacteria in the reactor. Some dominant OTUs could be classified until genus level, e.g. *Clostridium* (OTU 11065), *Dehalobacterium* (OTUs 7278 and 3040) or *Sedimentibacter* (OTU 14431). Members of *Carnobacteriaceae* (OTU 7233) or *Ruminococaceae* (OTU 3982) families were also dominant. Nevertheless, another group of five OTUs (OTUs 2413, 2612, 2995 and 6768) were classified as *Clostridiales* order, suggesting their endemic nature in the reactor.

Chloroflexi, another important phylum in methanogenic reactors was represented by the genus *Anaerolineales* (OTUs 12723 and 165). On the other hand, the *Hyd24-12 OP8*, *Synergistetes* and *Verrucromicrobia* phyla were represented by only one OTU, suggesting a relative low diversity, high specialization among those phyla and high stability of those populations in the reactor.

Table 4. 3. Taxonomic classification of the 20 most abundant bacterial OTUs. Relative abundances are expressed in % in each day. Classification levels were separated by semicolon as follows: phylum (p_), class (c_), order (o_), family (f_) genus (g_) and species (s_). OTUs were ranked in terms of decreasing abundance, according to day 356.

#OTU ID/Day	1st operation		2nd operation				2nd operation Stop			Classification
	15	57	* 271	306	334	356	383	439	531	
7278	0,3	0,4	0,4	1,1	1,8	9,3	8,7	3,3	0,2	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Dehalobacteriaceae; g__Dehalobacterium; s__
2995	0,1	0,1	0,1	0,1	0	7,8	8,2	6,1	0,6	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__ ; g__ ; s__
3387	7,6	9,8	16,1	5,2	1,2	6,8	6,2	1,2	2,5	p__Hyd24-12; c__ ; o__ ; f__ ; g__ ; s__
12723	4,5	5,6	3,3	8,3	6,1	5,9	7,3	12,2	6,9	p__Chloroflexi; c__Anaerolineae; o__Anaerolineales; f__Anaerolinaceae; g__T78; s__
6030	4,2	6,4	1,4	1,5	40,5	4,4	3,2	3,3	2,4	p__Verrucomicrobia; c__[Pedosphaerae]; o__[Pedosphaerales]; f__R4-41B; g__ ; s__
6768	0	0,1	0	0,1	1,2	3,2	2,5	1,1	0,3	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__ ; g__ ; s__
11065	1,6	1,1	1,4	0,3	1,6	2,7	0,4	2,5	6,7	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Clostridium; s__
13639	0,6	0,5	0,9	0,5	1,9	2,7	0,7	2,8	2	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__ ; g__ ; s__
3040	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	2	1,6	0,7	0,1	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Dehalobacteriaceae; g__Dehalobacterium; s__
4593	1,5	1,4	1,1	0,2	0,7	1,6	0,6	0,2	0,6	p__Synergistetes; c__Synergistia; o__Synergistales; f__Dethiosulfovibrionaceae; g__PD-UASB-13; s__
2413	1,6	1,8	1,2	0,3	0,9	1,5	1,8	1,5	0,8	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__ ; g__ ; s__
8549	0	0	0	0,2	0,1	1,5	0,3	0,1	0,2	p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae
13451	0,9	0,5	0,8	0,5	0,5	1,5	1,2	2,3	2,3	p__Proteobacteria; c__Deltaproteobacteria; o__Syntrophobacteriales; f__Syntrophorhabdaceae; g__ ; s__
2312	2,3	2,4	4,6	3,5	0,4	1,5	2,8	1,5	2,2	p__OP8; c__OP8_1; o__SHA-124; f__ ; g__ ; s__
3204	0	0	0	0	0	1,3	0,8	0,3	0,6	p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Paludibacter; s__
2612	0,1	0	0	0,5	1,4	1,2	1,8	0,1	0	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__ ; g__ ; s__
165	0,8	1,7	0,6	1,3	1	1,2	1	3	1,1	p__Chloroflexi; c__Anaerolineae; o__Anaerolineales; f__Anaerolinaceae; g__T78; s__
14431	0	0	0	0,5	0,2	1,2	0,4	0,1	0	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__[Tissierellaceae]; g__Sedimentibacter; s__
7233	0,1	0,1	0,2	4,5	1,3	1,2	1	0,4	0,2	p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Carnobacteriaceae; g__ ; s__
3982	0	0	0	0	0,2	1	0,2	1,9	3,5	p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__ ; s__

4.3.2 Dynamics of relevant bacterial groups in the reactor

Positive and negative selection of some groups along time was observed. At *phylum* level, *Firmicutes* was clearly selected positively. On the other hand, *Thermotogae* was selected negatively, reducing its relative abundance (Table 4.2). Other phyla had no clear tendency along time, namely, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Synergistetes* and *Proteobacteria*. Although these *phyla* did not increase their relative abundances, they were able to persist and dominate the bacterial consortium.

According to Microbial Ecology, three mechanisms; resistance, resilience and functional redundancy, could explain microbial community composition. Resistance can be seen as the degree to which microbial composition remains unchanged in response to a disturbance. Resilience accounts for the ability of microbial consortia to return to the original composition after being disturbed. Finally, functional redundancy refers to the ability of one taxon to replace the functional role of another taxon in the community, at the same rate (Allison & Martiny, 2008). Carballa *et al*, (2015) applied this ecological hypothesis to anaerobic reactors. They created a classification scheme of the anaerobic microbiome in response to a disturbance. In this work, *Clostridium* and *Chloroflexi* (hydrolytic-fermentative bacteria) could be classified as both functional redundant and resistant while *Synergistetes* and *Verrucomicrobia* (syntrophic bacteria) would be resilient and resistant populations.

Verrucomicrobia was 6% abundant on average with the exception of day 334, in which the abundance was abnormally high (Tables 4.2 and 4.3). These results were confirmed by sequencing the duplicate samples and also by FLX pyrosequencing (data not shown). In addition, the other major phyla showed no anomalies in day 334 and had consistent profiles along time. However, the *Verrucomicrobiales* burst could not be linked to operational parameters like CH₄ production, HRT or the OLR (Table 4.1). One possible speculation is that the changes in the feeding regime from diluted vinasse (25%) to raw vinasse (100%) in that period may have been a factor that influenced the burst. The vinasse dilution strategy was necessary to cope with the high variations in organic loading rate of the vinasse produced over time, in order to avoid the reactor overload.

Verrucomicrobia is a phylum widely distributed in anaerobic environments such as, freshwater and ocean sediments, soils, vertebrate and invertebrate guts (Wagner & Horn,

2006). Although its ecological relevance, only a few members have been cultivated. In anaerobic environments, they have been described as cellulolytic or saccharolytic members (Martinez-Garcia, *et al.*, 2012, Cardman *et al.*, 2014). As mentioned previously, Martinez *et al.*, (2014) found a high percentage (35%) of this phylum in a UASB reactor treating vinasse from ethanol production. The authors suggests that *Verrucomicrobia* might contribute to the acidogenic stages and acetate oxidation in the reactor. In this reactor, *Verrucomicrobiales* could be playing a similar role.

Another major *phylum* in this work, *Firmicutes* is considered a cosmopolitan group in anaerobic reactors. They are a diverse taxonomic group involved in substrate hydrolysis and acetogenesis that often dominate anaerobic reactors and digesters treating several kinds of substrates (Nelson *et al.*, 2011). In Table 4.3, 10 out of 11 OTUs classified as *Firmicutes*, were within the order *Clostridiales*. The most abundant group was classified as genus *Dehalobacterium* (OTU 7278). It increased its abundance from 0.3 to 9.4% during the two operation periods. After the reactor stop (day 356), the OTU decreased its abundance to 0.2% on day 531. This value was similar to those in the start-up period during the first year (days 15 and 57). This result might suggest the positive selection of this genus in response to vinasse feeding. To date, the members of *Dehalobacterium* have been reported to anaerobically ferment or respire organohalides (dichloromethane, chloroform) to produce, acetate, formate and inorganic chloride (Mägli, 1996; Justicia-León *et al.*, 2012). The presence of this OTU in the vinasse reactor could involve acetogenesis from organohalides or alternatively phenolic compounds present in the vinasse.

The second most abundant group related to *Firmicutes* (OTU 2995) could not be classified in lower levels than the order *Clostridiales*. To know the identity of this unclassified sequence with others deposited in the NCBI database, a comparison by BLAST was performed (Table 4.4). Notably, a 100% similarity with a sequence reported in an anaerobic digester was found (de Vrieze *et al.*, 2016. Direct submission). Likewise, this OTU increased its abundance from 0.1 to 7.8% in day 356. During the second operation stop, its abundance decreased to 0.6% on day 531.

Among the top 20 OTUs, *Chloroflexi* was another dominant taxon represented by the order *Anaerolineales*, belonging to *T78* genus (OTU 12723). OTU 12723 was present in approximately 7%, during the entire period, while the other OTU (165) was in lower

abundance ($\leq 1.1\%$). Therefore, the conditions in which the reactor was operated were advantageous for the retention of a stable population of *Chloroflexi* in the reactor. *Chloroflexi* might be part of the resistant population in the microbial community. *Chloroflexi* is another cosmopolitan or major phyla present in anaerobic reactors (Nelson *et al.*, 2011). A metagenomic study analysed this phylum in aquifer sediments predicted that *Chloroflexi* are likely to compete for labile carbon molecules, degrading starch, sugars, and peptides and providing organic acids to other organisms in the sediment (*e.g.*, acetoclastic methanogens and metal-respiring bacteria) (Hug *et al.*, 2013). In other study, it was proposed that uncultured *Anaerolinea* sp. scavenge organic compounds from cellular debris in anaerobic reactors (Sekiguchi *et al.*, 2001, Kidiachi *et al.*, 2012). This role may be analogue to the catabolism of cellulose and cellulosic derivatives and sugars present in the vinasse.

Among the *Proteobacteria*, another major phylum present in the reactor, two OTUs classified as *Syntrophobacter* (1.3-0.1%) and *Syntrophus* (2-0.5%) genus decreased their abundances during the first operation period, remaining in low abundance during the second one (data not shown). Both, *Syntrophus* as well as *Syntrophobacter* genus are well known acetogenic bacteria in anaerobic reactors. In this case, the conditions in the reactor were negative to the proliferation of those organisms.

Alternatively, the most abundant group of *Proteobacteria* in Table 4.3 was affiliated with *Syntrophorhabdeaceae* (OTU 13451) family. This group steadily increased its abundances throughout the analysed period (days 15-531). Members of the *Syntrophorhabdeaceae* were isolated and reported as important populations in anaerobic phenol-degrading methanogenic consortia present in wastewater treatment plants (Chen *et al.*, 2009). *Syntrophorhabdus aromaticivorans* *gen. nov.*, *sp. nov.*, was the first isolated member (from an anaerobic reactor) which degraded phenol to acetate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens (Qiu *et al.*, 2008).

As mentioned previously, phenolic compounds are frequently reported in vinasse from sugar cane as part of the organic fraction of the effluent. Those phenolic compounds present in vinasse might explain the increase in relative abundance of OTU 13451 over time. Therefore, we speculate that in this reactor OTU 13451 could represent a resistant group of acetogenic bacteria that replaced other acetogenic counterparts (*e. g.*, *Syntrophobacter* and *Syntrophus*) by functional redundancy.

The *candidate phyla Hyd 24-12* was another important group present in all the samples analysed. On average, the sequence abundance was 6%, being more abundant in the first period (Table 4.2). Only one OTU was on the 20 most abundant list (OTU 3387). The low diversity of this group in the reactor might involve some level of functional specialization. Until recently, the role of this phyla in anaerobic systems was poorly characterized due to the lack of culturable representatives. Kirkegaard *et al.* (2016) studied this group in 29 anaerobic digesters using *in silico* analysis of biomass samples. The authors reported *candidate phyla Hyd 24-12* to be present in most mesophilic digesters. Metabolic genome reconstruction showed that members of this *phylum* were Gram-negative anaerobic bacteria that produced acetate and hydrogen from simple sugars (hexose and pentose) by fermentation, and that they may play a role in sulphur cycling. The authors proposed the name '*Candidatus Fermentibacter*' *gen. nov.* for this organisms (Kirkegaard *et al.*, 2016). Again, the presence of carbohydrates in the vinasse could explain their abundance as acidogens in the reactor.

All the phylogenetic information analysed showed that the microbial structure of the community present in the start-up (day 15) progressively adapted to the effluent. Those members of the community with the ability to degrade the organic components present in the vinasse were selected. Indeed, the dominant *phyla* and dominant OTUs in those *phyla* could be linked to vinasse degradation at the end of the second operational period.

On the other hand, a starvation period of approximately five months (days 356 to 531) did not show an obvious effect over the bacterial community structure (Figure 4.1). Drastic variations in the major *phyla* or dominant OTUs was neither observed (Table 4.3). In addition, no obvious differences in the community structure were observed during the first operation period (days 15 and 57) and the beginning of the second operation period (day 271 and 306). Furthermore, the performance of the reactor during the second operation period (days 271 to) was better and the biogas production begun faster than the start-up (days 15 and 57, Table 4.1). Thus, biomass adaptation to vinasse during the starvation period could be involved in the improved performance during the second operation period.

These results were important to plan future operation regimes in this type of full-scale system. Eventually, reactors must be stop or must be seasonally operated and there is a

lack of information about the microbial stability in the anaerobic sludge during those particular periods. Moreover, the factors that often govern scale-lab reactors might not be representative of full-scale systems. While lab-scale systems seem to have very dynamic microbial communities (Fernandez *et al.*, 1999), full-scale systems tend to have very stable communities (Werner, *et al.*, 2011) with high resistance against moderate shifts of abiotic parameters in general (Lucas *et al.*, 2015). In long-term studies, environmental fluctuations in full-scale would be moderate compared to lab-scale reactors and deterministic factors were suggested to rule the microbial dynamics (Lucas *et al.*, 2015). In this work, we confirmed that controlled operation of the reactor can determine the dynamics of the microbial community.

4.3.2 Environmental distribution of dominant OTUs

Representative sequences of the dominant OTUs of each major phyla were compared against public databases to explore their natural or engineered habitat distribution. In table 4.4, the classification (QIIME) and percentage of identity using BLAST and NCBI nucleotide database of the two most abundant OTU per dominant *phyla* are presented. Ten out of eleven sequences compared showed a high percentage of similarity with other 16S *rRNA gene* sequences reported in anaerobic methanogenic or hydrogenotrophic reactors reported elsewhere (*e.g.*: Brazil, Belgium, China, France and USA). This result suggests an environmental fingerprint of anaerobic engineered systems in the sequences analysed.

Most abundant sequences among the *Clostridiales* had 99% identity with a sequence reported in a bio-hydrogen microbial electrolysis cell, fed with agro-industrial fermented wastewater (OTU 7278) and 100% identity with a sequence reported in an anaerobic digester study (OTU 2995). *Chloroflexi* sequences had 99% identity with sequences reported in a combined digestion system treating cellulosic ethanol production wastewater (OTU 12723) and a petrochemical wastewater treatment plant sludge (OTU 165). *Verrucomicrobiales* sequence (OTU 6030) was classified into Family R4-41B and it showed a 100% identity with a sequence reported in a bio-hydrogen reactor. *Proteobacteria* sequences had 99% similarity with sequences retrieved from an anaerobic lagoon treating swine wastewater (OTU 4370) and another anaerobic digester (OTU 13451). *Synergistetes* sequences had 100% identity with sequences reported in a hydrogen reactor fed with

glycerol (OTU 15989) and another anaerobic lagoon (OTU 3192)

It is noteworthy that only one sequence (OTU 2312) showed similarity with a natural environmental sample (freshwater lake sediment). In spite of harbouring relative diverse microbial communities, anaerobic digesters seem to be 'picky' in selecting specific taxonomic bacterial groups to efficiently accomplish the organic matter degradation.

Table 4. 4. Classification according to QIIME using RDP database and 1st hit of BLAST using nucleotide database of the two most abundant OTUs in each major phylum found in this work.

N°OTU	Phylum	Classification QIIME	% Identity (BLAST nt)	Acc. Number	Reference	Env/source	
7278	Clostridium	g_Dehalobacterium	99	Uncultured bacterium clone OTU205	KU998468	Marone <i>et al.</i> , 2016 Unpublished	Wastewater, microbial electrolysis cell
2995	Clostridium	o_Clostridiales_f_g	100	Uncultured Eubacteriaceae bacterium	LT625296	De Vrieze <i>et al.</i> , 2016. Unpublished	Anaerobic digestion
12723	Chloroflexi	g_T78	99	Uncultured bacterium isolate DGGE	KP101330	Shan <i>et al.</i> , 2014	Combined anaerobic and aerobic digestion system treating cellulosic ethanol production wastewater
165	Chloroflexi	g_T78	99	Uncultured bacterium clone Wu-A71	KJ782703	Wu,C. and Zhou,Y. 2014. Unpublished	Petrochemical wastewater treatment plant sludge
3387	Hyd24-13	p_Hyd24-12_c_o_f_g	99	Uncultured bacterium isolate DGGE	KP101347	Shan <i>et al.</i> , 2014	Combined anaerobic and aerobic digestion system treating cellulosic ethanol production wastewater
6030	Verrucomicrobia	f_R4-41B_o_g	100	Uncultured bacterium clone OTU882	KX633833	Toledo-Alarcon <i>et al.</i> , 2016. Unpublished	Dark fermentation continuous reactor fed with glycerol
2312	Verrucomicrobia	o_SHA-124_f_g	100	Uncultured bacterium	AB928704	Tsuboi <i>et al.</i> , 2014	Freshwater lake sediment
13451	Proteobacteria	f_Syntrophorhabdaceae_g	99	Uncultured prokaryote clone 2323	KT040076	Chen <i>et al.</i> , 2015. Unpublished	Anaerobic digester
4370	Proteobacteria	f_Ectothiorhodospiraceae_o	99	Uncultured Ralstonia sp. clone	JQ906947	Cardinali-Rezende, <i>et al.</i> , 2012. Unpublished	Swine anaerobic lagoon
15989	Synergistetes	g_E6	100	Uncultured bacterium clone OTU1081	KX634032	Toledo-Alarcon <i>et al.</i> , 2016. Unpublished	Dark fermentation continuous reactor fed with glycerol
3192	Synergistetes	g_vadinCA02	100	Uncultured Synergistaceae bacterium clone S5_19_16S	KX672527	Zhang <i>et al.</i> , 2016	Fermentation pit mud

4.3.4 Methanogenic community

Methanogenic community structure was studied by qPCR using 16S rRNA gene regions from different known methanogens, belonging to different taxonomical orders (Figure 4.2, Table 4S.2). When gene copy numbers of the different taxonomic orders were compared, hydrogenotrophic *Methanobacteriales* (MBT) had the highest copy numbers per ng of total DNA. MBT had a mean value of 1.6×10^6 copies. ngDNA⁻¹. The second abundant order was the acetoclastic *Methanosarcinales* (3.9×10^4 copies. ngDNA⁻¹). Acetoclastic dominance in this order was further confirmed by quantifying *Methanosaetaceae* and

Methanosarcinaceae families (data not shown). Hydrogenotrophic *Methanomicrobiales* was the third order of methanogens found in the reactor but in a low abundance (3.6×10^1 copies. ngDNA⁻¹). *Methanococcales* were also tested but not detected. These results suggest hydrogenotrophic methanogens would be an important population in the reactor that might outnumbered their acetoclastic counterparts.

Recently, several studies have found hydrogenotrophic methanogens dominating lab scale and full-scale reactors, often under stressing conditions, for example, high ammonium concentration, high OLR or low pH (Lee *et al.*, 2009, Song *et al.*, 2010, Demirel, 2014, Jang *et al.*, 2014, Wilkins *et al.*, 2015, da Silva-Martins *et al.*, 2016). In this work, the high potassium concentrations or toxic chemical components present in the vinasse could have inhibit acetoclastic methanogens proliferation.

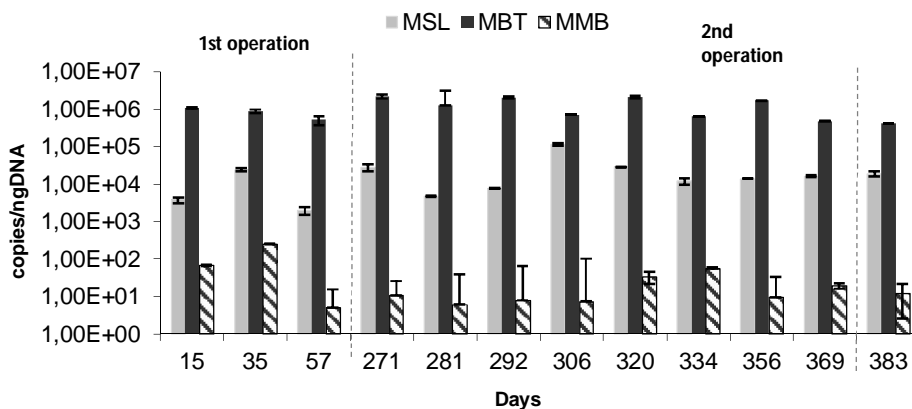


Figure 4. 2. Methanogenic community structure analysed by qPCR of the 16S rRNA gene of three methanogenic orders (MSL) *Methanosarcinales*, (MBT) *Methanobacteriales* and (MMB) *Methanomicrobiales*.

Which methanogenic pathway prevails under the different environmental conditions is currently a major question in the microbial ecology of anaerobic digestion. The knowledge about this topic is still in its infancy. Clear correlations and profiles may be shielded in microbial ecology studies due to the broad range of effluents and reactor configurations, in comparison with the amount of genetic data available to date. The effort to generate and compile genetic and operational data will be necessary to find answers to this sort of question.

The *mcrA* gene quantification accounted for total methanogenic organisms (Figure 4.3, Table 4S.3). On day 356, 7.9×10^8 copies. ngDNA⁻¹ were calculated. This functional gene catalyses the last enzymatic step in methane formation, it contains phylogenetic information and is present in a single copy per genome. *mcrA* gene copies.ng DNA correlated with the total solid content in the reactor (Pearson correlation coefficient of 0.81, p-value 0.05).



Figure 4. 3. Evolution of total methanogens analysed by qPCR of the *mcrA* gene (bars) and total suspended solids (dashed line) in the reactor.

The solids 'growth' in the reactor was linked to a growth of the methanogenic archaea present in the sludge (Figure 4.3). Moreover, in the last two dates analysed, a sharp increase of the solids in the reactor and a transition state of the initial flocculent sludge to smooth granules formation was observed (López *et al.*, 2016). These results suggest that the solid increase in the reactor were caused by the aggregation state of the sludge. In turn, this aggregation retained the biomass in the reactor and supported the growth of the methanogens.

4.4 Conclusions

The bacterial component of the microbial community in the reactor was quite diverse during the start-up. Some groups with the ability to metabolize the organic components present in the vinasse were selected and became dominant along time. Hydrogenotrophic members

dominated the methanogenic population, suggesting this pathway as relevant in the reactor. Hydrogenotrophic methanogens could be resistant to the high potassium concentration and phenolic compounds present in the vinasse. The whole community showed to be robust and stable over time, probably due to the reactor configuration used. Long-term starvation did not affect the microbial structure.

Acknowledgements

This work and Cecilia Callejas PhD scholarship were supported by the national agency for innovation and research (ANII), by an energy sector grant (ANII FSE17

4.5 References

- Allison, S.D., Martiny, J. B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *PNAS*, 105 (Supplement 1), 11512-11519.
- Cabezas, A., de Araujo, J.C., Callejas, C., Galès, A., Hamelin, J., Marone, A., ... & Etchebehere, C. (2015). How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process?. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, 14(4), 555-593.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., ... & Huttley, G.A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7(5), 335-336.
- Carballa, M., Regueiro, L., & Lema, J. M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr Opin Biotechnol*, 33, 103-111.
- Cardman, Z., Arnosti, C., Durbin, A., Ziervogel, K., Cox, C., Steen, A.D., Teske, A. (2014). Verrucomicrobia are candidates for polysaccharide-degrading bacterioplankton in an arctic fjord of Svalbard. *Appl Environ Microbiol*, 80(12), 3749-3756.
- Chen, C.-L., Wu, J.-H., Tseng, I.-C., Liang, T.-M., Liu, W.-T., 2009. Characterization of active microbes in a full-scale anaerobifluidized bed reactor treating phenolic wastewater. *Microbes Environ*, 24, 144e153.
- Christofoletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S. (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste manage*, 33(12), 2752-2761.
- Claesson, M.J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., ... & O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS one*, 4(8), e6669.
- da Silva Martins, A., Ornelas Ferreira, B., Ribeiro, N. C., Martins, R., Rabelo Leite, L., Oliveira, G., ... & de Araujo, J. C. (2016). Metagenomic analysis and performance of a mesophilic anaerobic reactor treating food waste at various load rates. *Environ Technol*, 1-11.
- Demirel, B. (2014). Major pathway of methane formation from energy crops in agricultural biogas digesters Critical Reviews in *Environ Sci Technol*, 44, 199-222.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S. (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol*, 62(3), 313-322.
- Edgar, R.C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461.

- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L. (2011). Vinasses: characterization and treatments. *Waste Manag Res*, 29(12), 1235-1250.
- España-Gamboa, E.I., Mijangos-Cortés, J.O., Hernández-Zárate, G., Maldonado, J.A.D., Alzate-Gaviria, L. M. (2012). Methane production by treating vinasses from hydrous ethanol using a modified UASB reactor. *Biotechnol Biofuels*, 5(1), 82.
- FAO (2013). Biofuels and food security: A report by the High Level Panel of Experts on Food Security and Nutrition of the Committee on World Food Security. Food and Agriculture Organization, Rome
- Farag, I.F., Davis, J.P., Youssef, N.H., Elshahed, M.S. (2014). Global patterns of abundance, diversity and community structure of the Aminicenantes (candidate phylum OP8). *PloS one*, 9(3), e92139.
- Fernández, A., Huang, S., Seston, S., Xing, J., Hickey, R., Criddle, C., Tiedje, J. (1999). How stable is stable? Function versus community composition. *Applied Environ Microbiol*, 65(8), 3697-3704.
- Hug, L.A., Castelle, C.J., Wrighton, K.C., Thomas, B.C., Sharon, I., Frischkorn, K.R., ... & Banfield, J. F. (2013). Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. *Microbiome*, 1(1), 1.
- Jang, H.M., Kim, J.H., Ha, J.H., Park, J.M., (2014). Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Biores Technol*, 165,174-82.
- Justicia-Leon, S.D., Ritalahti, K.M., Mack, E.E., Löffler, F.E. (2012). Dichloromethane fermentation by a *Dehalobacter* sp. in an enrichment culture derived from pristine river sediment. *Appl Environ Microbiol*, 78(4), 1288-1291.
- Kindaichi, T., Yuri, S., Ozaki, N., Ohashi, A. (2012). Ecophysiological role and function of uncultured *Chloroflexi* in an anammox reactor. *Water Sci Technol*, 66, 2556-2561. 10.2166/wst.2012.479.
- Kirkegaard, R.H., Dueholm, M.S., McIlroy, S.J., Nierychlo, M., Karst, S.M., Albertsen, M., Nielsen, P.H. (2016). Genomic insights into members of the candidate phylum Hyd24-12 common in mesophilic anaerobic digesters. *ISME J* doi: 10.1038/ismej.2016.43
- Lee, C., Kim, J., Hwang, K., O'Flaherty, V., Hwang, S., (2009). Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. *Water Res*, 43, 157–165.
- Lettinga, G. (2001). Digestion and degradation, air for life. *Wat Sci Technol*, 44(8), 157-176.
- Lettinga, G., Pol, L.H., Koster, I.W., Wiegant, W.M., De Zeeuw, W.J., Rinzema, A., ... & Hobma, S.W. (1984). High-rate anaerobic waste-water treatment using the UASB reactor under a wide range of temperature conditions. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 2(1), 253-284.
- López, I. (2016). The potential of biogas production in Uruguay. *Renewable Sust En Rev*, 54, 1580-1591.
- López, I., Borzacconi L., Passeggi, M. (2016). Presentación oral. Start-up and performance

- of a real scale anaerobic reactor treating vinasse. En: XII DAAL Congreso Latinoamericano de Digestión Anaerobia ,Cuzco, Perú.
- López, I., Borzacconi, L. (2011). Modelling of an EGSB treating sugarcane vinasse using first-order variable kinetics. *Water Science and Technology*, 64(10), 2080.
- Lucas, R., Kuchenbuch, A., Fetzter, I., Harms, H., Kleinstüber, S. (2015). Long-term monitoring reveals stable and remarkably similar microbial communities in parallel full-scale biogas reactors digesting energy crops. *FEMS Microbiol Ecol*, 91(3), fiv004.
- Lynch, M.D., Neufeld, J.D. (2015). Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat Rev Microbiol*, 13(4), 217-229.
- Mägli, A., Wendt, M., Leisinger, T. (1996). Isolation and characterization of *Dehalobacterium formicoaceticum* gen. nov. sp. nov., a strictly anaerobic bacterium utilizing dichloromethane as source of carbon and energy. *Arch Microbiol*, 166(2), 101-108.
- McCarty, P. L. (2001). The development of anaerobic treatment and its future. *Water Science and Technology*, 44(8), 149-156.
- Martínez, M.A., Romero, H., Perotti, N.I. (2014). Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. *Biores Technol*, 153, 388-392.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D.M., Swan, B.K., Arnosti, C., Chain, P.S., Reitenga, K.G., ... & Thompson, B. (2012). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of Verrucomicrobia. *PLoS One*, 7(4), e35314.
- Moraes, B.S., Zaiat, M., Bonomi, A. (2015). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renew Sust Energy Rev*, 44, 888-903.
- Nelson, M.C., Morrison, M., Yu, Z. (2011). A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Biores Technol*, 102(4), 3730-3739.
- Nelson, W.C., Stegen, J.C. (2015). The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Front Microbiol*, 6, 713.
- Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevielle, P., Recous, S. (2008) Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Biores Technol*, 99, 1553–1562.
- Pinto, A.J., Raskin, L. (2012). PCR biases distort bacterial and archaeal community structure in pyrosequencing datasets. *PloS one*, 7(8), e43093.
- Qiu, Y.L., Hanada, S., Ohashi, A., Harada, H., Kamaqata, Y., Sekiguchi, Y. (2008). *Syntrophorhabdus aromaticivorans* gen. nov. sp. nov., the first cultured anaerobe capable of degrading phenol to acetate in obligate syntrophic associations with a hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol*, 74(7), 2051-2058.
- Robertello, A. (1982). Upgrading of agricultural and agroindustrial wastes: the treatment of distillery effluents (vinasses) in Italy. *Agric Wastes*, 4, 387–395.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H.M. (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. *J Biotechnol*, 157(4), 524-546.

- Sekiguchi, Y., Takahashi, H., Kamagata, Y., Ohashi, A., Harada, H. (2001). *In situ* detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green non-sulfur bacteria, subdivision I. *Appl Environ Microbiol*, 67(12), 5740-5749.
- Shan, L., Yu, Y., Zhu, Z., Zhao, W., Wang, H., Ambuchi, J.J., Feng, Y. (2015). Microbial community analysis in a combined anaerobic and aerobic digestion system for treatment of cellulosic ethanol production wastewater. *Environ Sci Poll Res*, 22(22), 17789-17798.
- Song, M., Shin, S.G., Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Biores Technol*, 101(1), 23-28.
- Soto, M., Méndez, R., Lema, J. M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up. *Water Res*, 27(8), 1361-1376.
- Van Lier, J.B., Van der Zee, F.P., Frijters, C.T.M.J., Ersahin, M.E. (2015). Celebrating 40 years anaerobic sludge bed reactors for industrial wastewater treatment. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, 14(4), 681-702.
- Van Lier, J.B., Mahmoud, N., Zeeman, G. (2008). Anaerobic biological wastewater treatment. In: Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjamovic D (eds) *Biological wastewater treatment: principles, modeling and design*. IWA Publishing, London
- Van Lier, J. B., Tilche, A., Ahring, B. K., Macarie, H., Moletta, R., Dohanyos, M., ... & Verstraete, W. (2001). New perspectives in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 43(1), 1-18.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P.D., Dennis, P.G., Hugenholtz, P., Rabaey, K., Tyson, G.W. (2014). Deterministic processes guide long-term synchronised population dynamics in replicate anaerobic digesters. *ISME J*, 8(10), 2015-2028.
- Wagner, M., Horn, M. (2006). The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Opin Biotechnol*, 17(3), 241-249.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., ... & Andersen, L. T. (2011). Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *PNAS*, 108(10), 4158-4163.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass Bioenerg*, 19(2), 63-102.
- Wilkins, D., Lu, X.Y., Shen, Z., Chen, J., Lee, P.K. (2015). Pyrosequencing of *mcrA* and archaeal *16S rRNA* genes reveals diversity and substrate preferences of methanogen communities in anaerobic digesters. *Appl Environ Microbiol*, 81(2), 604-613.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89(6), 670-679.

4.6 Supplementary material

Table 4S. 1. Alpha diversity metrics. N° OTUs, Observed species, Phylogenetic distance (PD_tree) and Chao1 richness estimator.

Days	15	57	271	306	334	356	383	439	531
N° OTUs (97%)	2131	2243	2321	2113	1833	2010	2332	2041	2155
Obs. Species	2176	2239	2326	2109	1801	1988	2307	n.c	n.c
PD_tree	176	185	189	170	144	156	184	173	174
Chao 1	4916	5003	5238	4585	4331	4564	5268	4937	4743

*n.c, not calculated

Table 4S. 2. *mcrA* gene copy number per ng of total DNA values, specific methanogenic activity (SMA) and total solids in the reactor

Units	Copies.ng DNA ⁻¹		gCOD.gSSV ⁻¹ d ⁻¹	kg
Days	<i>mcrA</i>	<i>sd</i>	<i>SMA</i>	<i>TSS</i>
15	1,99E+07	6,30E+06	0,08	435
35	2,39E+07	5,02E+06	0,11	553
271	9,54E+07	2,92E+07	0,08	179
306	3,15E+07	5,86E+06	0,35	617
334	1,96E+08	1,51E+07	0,4	556
356	7,91E+08	2,08E+08	0,3	803
383	1,02E+09	2,81E+08	0,21	982
Mean	1,17E+09		Pearson 0,23	Pearson 0,81

Table 4S. 3. *16S rRNA* gene copy number per ng of total DNA of methanogenic orders: MSL (*Methanosarcinales*); MBT (*Methanobacteriales*) and MMB (*Methanomicrobiales*).

Days	Copies.ng DNA ⁻¹					
	<i>MSL</i>	<i>sd</i>	<i>MBT</i>	<i>sd</i>	<i>MMB</i>	<i>Sd</i>
15	3,76E+03	6,78E+02	1,08E+06	6,59E+04	6,81E+01	2,94E+00
35	2,46E+04	2,94E+03	8,84E+05	1,03E+05	2,52E+02	2,82E+00
57	1,99E+03	4,59E+02	5,15E+05	1,34E+05	5,05E+00	1,05E+01
271	2,80E+04	6,08E+03	2,20E+06	2,64E+05	1,06E+01	1,49E+01
281	4,75E+03	1,60E+02	1,28E+06	1,80E+06	6,03E+00	3,26E+01
292	7,70E+03	2,49E+02	2,05E+06	1,68E+05	7,97E+00	5,77E+0
306	1,17E+05	8,25E+03	7,01E+05	5,26E+03	7,41E+00	9,55E+01
320	2,87E+04	8,07E+02	2,13E+06	1,46E+05	3,29E+01	1,17E+01
334	1,20E+04	2,48E+03	6,59E+05	4,81E+03	5,71E+01	3,67E+00
356	1,41E+04	1,14E+02	1,69E+06	8,03E+03	9,46E+00	2,46E+01
369	1,64E+04	1,05E+03	4,74E+05	4,02E+03	1,92E+01	3,37E+00
383	1,89E+04	2,66E+03	4,22E+05	3,20E+03	1,22E+01	9,60E+00
439	3,87E+04	4,46E+02	2,90E+06	5,25E+04	1,61E+01	1,46E+01
531	2,22E+05	2,44E+03	5,22E+06	3,40E+04	5,65E+00	5,07E+01
Mean	3,84E+04	2,06E+03	1,59E+06	2,00E+05	3,64E+01	2,39E+01

Figure 4S. 2. Alpha diversity metrics plot

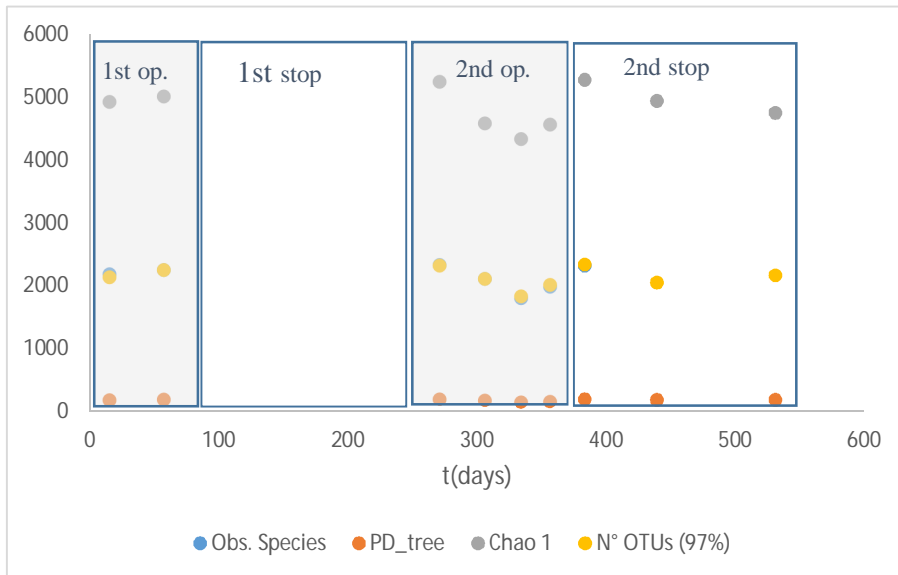
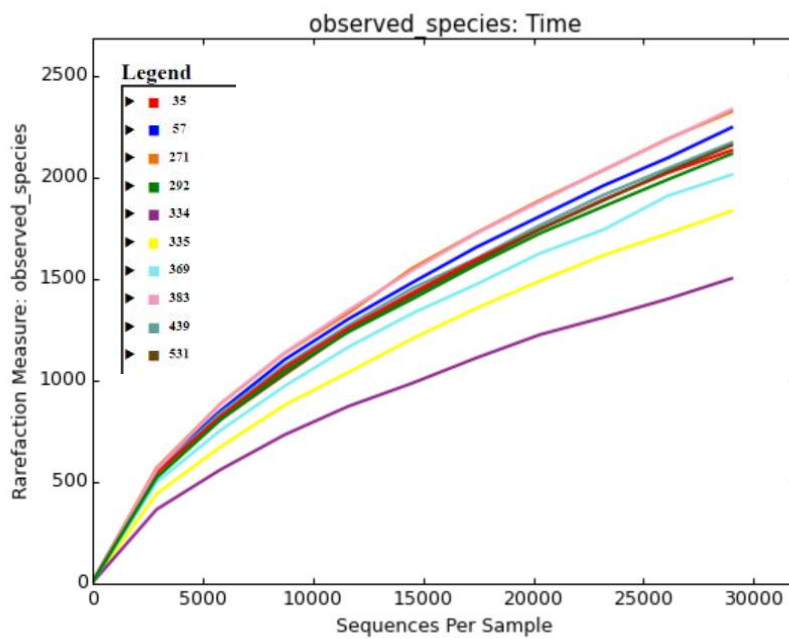


Figure 4S. 3. Rarefaction curves, 97% similarity cutoff



CAPITULO 5

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSEPECTIVAS

*"Everything is everywhere,
but the environment selects".
Lourens Baas Becking, 1934*

5.1 Principales hallazgos

Esta tesis exploró la microbiología asociada a dos reactores a escala piloto, operados en condiciones industriales reales y durante su fase de instalación y período de arranque. En términos generales el tipo de efluente afecta la selección de los grupos de microorganismos que luego se volvieron dominantes en lodo, constituyendo el fenómeno más evidente. En el reactor de efluente lácteo se seleccionaron organismos potencialmente fermentadores de aminoácidos provenientes de la caseína presente en el efluente, mientras que en el reactor de vinasa se seleccionaron organismos potencialmente degradadores de polisacáridos de origen vegetal y fermentadores de azúcares. En la figura 5.1 se comparan las estructuras de las comunidades microbianas, a nivel de los filos principales, tomando en cuenta las abundancias de las 29.000 secuencias analizadas.

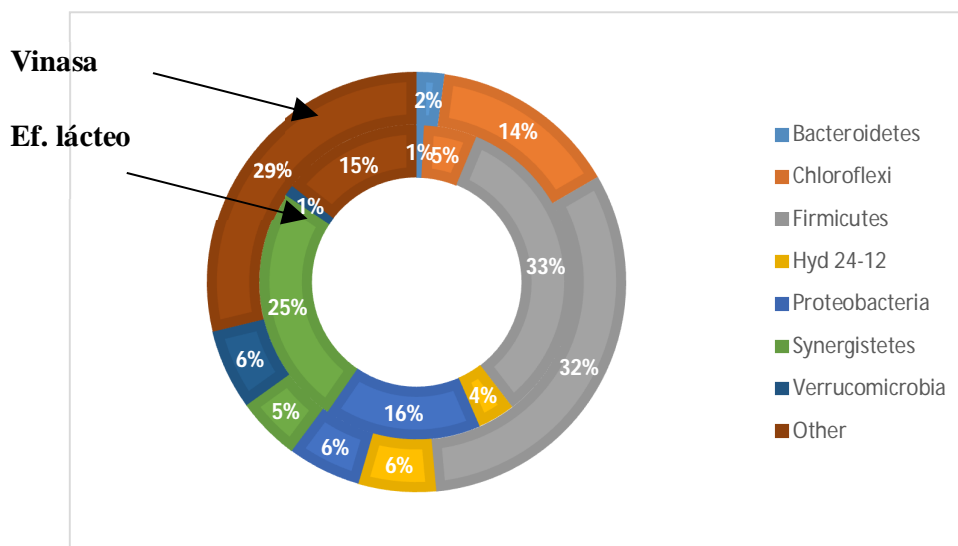


Figure 5. 1. Distribución de las abundancias relativas promedio de los filos principales en el reactor de efluente lácteo (círculo interno) y vinaza (círculo externo).

Por otro lado las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas parecen ser las dominantes en términos de número de individuos en todos los reactores analizados. Si bien esto no es una demostración que pueda generalizarse a todos los reactores a escala real, es evidencia de que la dominancia de los acetoclásticos no sería un paradigma sino que se

cumpliría en determinadas condiciones ambientales.

Conocer las dinámicas de las comunidades microbianas durante períodos tan particulares como la etapa arranque o la respuesta a cambios en la operación, e.g. un cambio de sustrato, brinda herramientas para poder mejorar dichos tiempos. Esto a su vez impacta en la reducción de costos y por lo tanto en la competitividad económica de la digestión anaerobia frente a otras tecnologías de tratamiento de residuos.

5.2 Arranque y performance de los reactores

Si bien el alcance de esta tesis no se centró en el aspecto ingenieril del diseño, es decir, en la evaluación de la performance de los reactores, algunos comentarios son pertinentes para entender los resultados microbiológicos obtenidos de los mismos. Para quienes estén interesados en el análisis en profundidad del desempeño del reactor lácteo, pueden consultar la tesis de maestría en Ing. Química de Fernández, A. (2016), mientras que los resultados del reactor de vinaza pueden consultarse en López, *et al.*, (2016).

Los dos reactores piloto fueron inoculados con lodo floculento, proveniente de una laguna anaerobia, de tratamiento de efluente de frigorífico. Los volúmenes de lodo requeridos fueron de entre 40 - 50 m³ para cada reactor. Idealmente ambos reactores deberían haber sido inoculados con lodo granular. Sin embargo, a nivel local no se cuenta con ningún reactor que contenga volúmenes de lodo granular que permita obtener los volúmenes de inóculo requeridos, sin afectar su volumen de biomasa total. Por otro lado, se eligió un lodo de tratamiento de efluente de frigorífico por la riqueza de los compuestos químicos presentes, como compuestos orgánicos, grasas y proteínas. Esto asegura en cierto modo una riqueza de microorganismos que facilitarían la adaptación de la biomasa a otros tipos de efluentes. La elección del inóculo no es un tema menor a la hora de arrancar un reactor, la historia del lodo y el tipo de efluente que haya tratado será importante para que dicho arranque sea exitoso.

En el trabajo de Regueiro *et al.*, (2014) en el cual estudia el efecto del tipo de sustrato en reactores de sólidos a escala de laboratorio, los autores observaron que los inóculos provenientes del tratamiento de residuos líquidos presentaba mayores dificultades de adaptación frente de un cambio de sustrato (líquido-sólido), frente a aquellos lodos que ya

se encontraban adaptados al tratamiento de residuos sólidos.

La evolución de los lodos se monitoreó en el tiempo a través del registro fotográfico (Anexo I) y dentro de los objetivos se planteó realizar la granulometría a partir del momento de su granulación. Sin embargo, este fenómeno no se llegó a observar en el período analizado. Sí bien se observaron cambios en el aspecto del lodo en ambos reactores que indicarían una evolución hacia la agregación, estrictamente no se pudo determinar un momento o período de aparición de gránulos. La “granulación” era un fenómeno esperable para lograr mejorar notablemente la retención de la biomasa dentro de los reactores. Si bien los resultados sugieren que este fenómeno estaba cercano en el tiempo, el estudio finalizó debido a los plazos y la culminación de la financiación de los proyectos.

En términos generales el arranque “intermitente” del reactor lácteo fue exitoso alcanzándose cargas orgánicas específicas relativamente altas ($1,8 \text{ kgDQO.kgSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$, ver anexo 1), un porcentaje de remoción de materia orgánica también alto ($\geq 85\%$), así como la producción de biogás rico en metano. El régimen de alimentación intermitente se realizó durante todo el período estudiado, excepto por un mes, durante el cual se realizó una parada de mantenimiento de la planta de producción.

Fue durante dicha pausa (aproximadamente 1 mes) que se produjo un incidente de descarga accidental de soda que se emplea para limpiar las cañerías de las líneas de la planta, hacia adentro del reactor. Durante esta perturbación el lodo dentro del reactor se sometió a dos condiciones desestabilizantes; por un lado el aumento en el pH que duró tres días y por el otro, la baja carga orgánica, debida a la suspensión de la alimentación. De este modo, no se logró compensar el aumento en la alcalinidad dentro del reactor debido a que los microorganismos no podían generar ácidos volátiles por falta de compuestos orgánicos. Como consecuencia, el reactor perdió actividad metanogénica, aunque logró recuperarse en el tiempo. Esto se logró aplicando un régimen de alimentación con un aumento gradual de la carga orgánica aplicada.

De todos modos, la sedimentabilidad (IVL) del lodo se vio severamente afectada por otro aspecto del diseño del reactor que se sumó y causó la desintegración de los agregados. En el diseño original, gran parte de los lodos que se flotaron debido a la adsorción de grasa fueron bombeados por una línea de recirculación que ayuda a mejorar la mezcla dentro del

reactor. Este pasaje del lodo por una bomba destruyó los agregados que luego fueron bombeados nuevamente al reactor. Debido a este fenómeno se “lavaron” cantidades importantes de lodo hacia el final de la operación. Como consecuencia, la línea de recirculación fue modificada y el reactor fue re-inoculado. Lamentablemente, poco tiempo después de la re-inoculación el proyecto culminó su financiación y la operación del reactor cesó.

Finalmente, el diseño de este reactor prevé la remoción mecánica de las grasas del efluente que son removidas por flotación. Por lo que dentro del reactor solo quedaba disponible una fracción (aproximadamente 50%) de las grasas totales para su biodegradación (Passeggi *et al.*, 2009). Además de las grasas, el efluente lácteo es rico en proteínas y lactosa. Por lo que el componente orgánico del efluente tendría dos cinéticas de hidrólisis distintas: las grasas por un lado y las proteínas (caseína) y los azúcares que son degradados más rápidamente, por el otro.

Por otro lado, el reactor de vinaza que arrancó con un régimen de alimentación continuo, fue operado con una carga orgánica específica menor que el lácteo ($0,7 \text{ kgDQO.kgSSV}^{-1}.\text{d}^{-1}$, ver anexo 1) debido a la posible toxicidad de varios componentes de este efluente. A pesar de esto, también se logró una buena performance en términos de remoción de materia orgánica (78%) y producción de biogás. El reactor permaneció en una modalidad de *batch* durante dos períodos interzafrales. Luego del primer período interzafral (días 57 a 271), la actividad metanogénica comenzó baja pero luego aumentó rápidamente cuando se comenzó a alimentar por segunda vez (día 271, ver Tabla 4.1). Esto podría interpretarse como una adaptación de la biomasa a la vinaza durante el período interzafral, o en su defecto, una reactivación de la biomasa ya adaptada. En general, no se registraron situaciones de desestabilización del reactor o accidentes en la operación durante el período analizado. De todos modos, no se lograron alcanzar las altas cargas planificadas, debido a los tiempos de ejecución del proyecto.

Es importante tener presente la escala de los reactores que se estudiaron, si bien ambos fueron parte de experiencias piloto, fueron operados a escala industrial y trataron efluentes reales de industrias locales (Tabla 5.1). En este sentido, la información microbiológica que se obtuvo emularía las condiciones en reactores a escala real, que muchas veces no se logra con reactores a escala de laboratorio.

Table 5. 1. Resumen de algunos parámetros de operación de los dos reactores en fase de arranque

	V (m ³)	Biomasa inicial (kg)	Carga (kg DQO.kg SSV ⁻¹ .d ⁻¹)	% Biogás	% máx. Remoción DQO
Vinaza	100	400	1,0 - 5,0	65 - 75	90
Ef. Lácteo	100	1300	1,5 - 5,6	65 - 75	≥85

Por otro lado, la experiencia de utilizar esta biotecnología para tratar los efluentes generados por parte de industrias locales resultó positiva, ya que el sector industrial local aún presenta cierta inercia en su implementación. La digestión anaerobia es una biotecnología que valoriza los residuos tratados, permitiendo recuperar energía en forma de biogás (metano), simultáneamente a la reducción en la concentración de materia orgánica. El biogás generado permite además reducir el gasto de energía *on-site* a partir de materiales que de otra forma, irían a rellenos sanitarios, tratamientos aerobios o a piletas anaerobias, liberando CO₂ y CH₄ a la atmósfera y contribuyendo de esta forma al efecto invernadero. Otro aspecto importante que resultó de la experiencia con estos reactores fue la demostración de que con la operación adecuada, por parte de personal formando en el área, es posible tratar con éxito dos efluentes tradicionalmente considerados “difíciles” (Fernández, 2016, López, *et al.*, 2016).

5.3 Comunidades metanogénicas

Uno de los objetivos de la tesis fue el de conocer la vía de producción de metano en reactores a escala real. En base a antecedentes del grupo, se observó que en las actividades metanogénicas específicas (ensayos *batch*) frecuentemente no coincidían con la producción de metano en el reactor por kg SSV (actividad global calculada en el reactor), en los que se colectaba la muestra. Teóricamente ambas actividades deberían de coincidir ya que ambas son expresadas como la cantidad de metano producido por kg SSV. Sin embargo, generalmente la actividad medida en ensayos de *batch*, utilizando acetato en exceso como sustrato -y a pesar de que estas serían las condiciones óptimas- eran menores que las calculadas en los reactores a escala real. A partir de estas observaciones y de la bibliografía consultada (Schnürer *et al.*, 1999, Karakashev *et al.*, 2006, Demirel & Scherer, 2008, Westerholm *et al.*, 2011, Fotidis *et al.*, 2012), manejamos la hipótesis de que esta diferencia podría explicarse por el aporte de la actividad metanogénica

hidrogenotrófica, que en general no se realiza como técnica de rutina. Así surgió la idea de explorar la comunidad de arqueas metanogénicas a través de un abordaje independiente de cultivo y también de testear la actividad hidrogenotrófica empleando muestras de distintos lodos.

En un comienzo se realizó T-RFLP empleando juegos de *primers* específicos para arqueas con el objetivo de explorar dichas comunidades (material suplementario, Anexo I). Estos resultados no fueron concluyentes ya que no permitieron discriminar entre los distintos grupos de arqueas metanogénicas. Con el objetivo de identificar los grupos taxonómicos se clonó una de las muestras empleando los mismos *primers* que en el análisis de T-RFLP y las secuencias tuvieron un sesgo hacia el orden de los *Methanosarcinales*. Una vez que se analizó la cobertura de los *primers* con la herramienta *online probematch* de RDP, las secuencias de los *primers* fueron complementarias a solo 2% de las secuencias de *Methanobacteriales* depositadas (ver discusión capítulo 2). Luego de analizar estos resultados se decidió emplear otra técnica más cuantitativa. Fue así que finalmente la técnica de qPCR con *primers* específicos de distintos grupos de arqueas permitió conocer la estructura de dichas comunidades en los lodos estudiados.

No obstante la técnica de T-RFLP, permitió establecer por otro lado la estrategia de muestreo en los lodos. En base a los perfiles obtenidos a partir de distintas alturas del reactor, se estableció que las muestras de lodos más representativas se deberían tomar del grifo más cercano al suelo, en donde el manto de lodos se encontraba más concentrado (Anexo I).

En esta parte de la tesis (capítulo 2), se incluyó además un *set* de muestras obtenidas previamente al comienzo de mi tesis, de un reactor de efluente lácteo y que se encontraba operando de forma estable. Los resultados que obtuvimos empleando la técnica de qPCR en todas las muestras analizadas demostraron que al menos en términos de números de copias del gen *rARN de 16S*, las arqueas hidrogenotróficas (*Methanobacteriales*) serían dominantes sobre aquellas acetoclásticas (*Methanosarcinales*). Esto sería coincidente con los valores de actividades acetolásticas e hidrogenotróficas medidas para el reactor lácteo operando en forma estable del capítulo 2. Como ya se mencionó, cada vez es más importante la cantidad de estudios que demuestran que varios reactores anaerobios, tanto a escala de laboratorio como a escala real, se encuentran dominados por arqueas

hidrogenotróficas (Williams *et al.*, 2013). Esto estaría de acuerdo con otros estudios que demostraron además que las arqueas acetoclásticas (*Methanosaeta*) son muy sensibles al amonio, así como a otras moléculas inhibitorias y a cambios en el pH y la temperatura (Demirel & Scherer, 2008, Carballa *et al.*, 2015). Por lo que sería lógico que en reactores que tratan efluentes con una alta concentración de inhibidores como en el caso de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) en efluente lácteo (Alves *et al.*, 2009) y el potasio y los compuestos fenólicos en la vinaza (Wilkie *et al.*, 2000), la metanogénesis ocurra mayoritariamente por la vía hidrogenotrófica.

La hipótesis que se plantea actualmente para explicar la dominancia de las arqueas hidrogenotróficas se basa por un lado en los largos tiempos de duplicación y por otro en la labilidad de las arqueas acetoclásticas, que estarían ausentes en varios reactores como consecuencia de su inhibición por altas concentraciones de amonio, bajas temperaturas, altas concentraciones de acetato, etc. En su lugar el acetato generado a partir de la materia orgánica sería metabolizado por bacterias sintróficas oxidadoras de acetato (SAOB) a H₂ y CO₂, ambos sustratos de las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas. Este mecanismo daría robustez al proceso y sortearía la inhibición de la metanogénesis (Nettman *et al.*, 2010).

En esta discusión es importante tener en mente la historia de la degradación anaerobia. A partir de los estudios de Jeris & Mc Carty en la década de 1960, se creó el paradigma que sostiene que el 70% de la metanogénesis ocurre a través de la vía acetoclástica. Esto fue demostrado en ensayos en *batch*, empleando marcadores radiactivos. A partir de dicho trabajo se dio por zanjada una discusión académica de la época. Luego, esa idea prevaleció sin cuestionamientos hasta hace pocos años en que se comenzaron a encontrar lodos dominados por arqueas hidrogenotróficas.

Volviendo a los trabajos de Jeris & Mc Carty, es importante mencionar que los investigadores trabajaron con lodos de plantas de tratamiento de aguas cloacales y esto podría haber sido un factor importante en sus resultados. Este tipo de lodos posee una alta concentración de arqueas acetoclásticas (Raskin *et al.*, 1994, Demirel & Scherer, 2008), probablemente debido a la baja concentración de materia orgánica de las aguas cloacales, en comparación con otros efluentes. Además, si bien se trabajó con carbono marcado, lo

cual fue revolucionario para trazar la ruta metabólica del acetato, en ese tiempo se desconocía el “atajo” de la oxidación sintrófica de acetato (Figura 1.3) por lo que el acetato que entraba a esta vía y luego a la hidrogenotrófica no fue cuantificado. De hecho, el origen del lodo y la estructura de su comunidad microbiana era una pregunta remota en aquella época. Recientemente, con los abordajes independientes de cultivo hemos descubierto la diversidad de microorganismos y de estructuras de comunidades que habitan los distintos lodos anaerobios.

La importancia de conocer los distintos grupos de metanogénicos y sus abundancias en un lodo anaerobio, radica en las consecuencias que esto genera en los ensayos de actividad metanogénica específica y en el modelado de la digestión anaerobia. La actividad metanogénica específica se estaría subestimando en aquellos lodos en los cuales los hidrogenotróficos son dominantes, si solo se mide la actividad acetoclástica que tradicionalmente se ha asumido como la vía principal.

Esta discusión es aún incipiente y actualmente se están empleando varias técnicas para poder responder de forma robusta esta interrogante. Hasta el momento ninguna técnica por sí sola es capaz de “contar” de manera fiable la cantidad de los distintos microorganismos metanogénicos en una muestra. Por otro lado, la técnica de actividad metanogénica específica a partir de H_2/CO_2 no cuenta aún con un protocolo estandarizado de los ensayos - como en el caso de la actividad metanogénica a partir de acetato - lo que entonces dificulta la comparación de resultados. Además la suma algebraica de las dos actividades específicas, expresadas por la cantidad SSV no representa la actividad potencial máxima de un lodo, probablemente porque sea sobre estimada. Para poder sumar algebraicamente las dos actividades metanogénicas específicas y conocer la actividad global, se debería conocer qué proporción de los SSV corresponde a los metanogénicos acetoclásticos (SSV_A) y qué otra, a los hidrogenotróficos (SSV_H) para poder dividir la producción de metano por la cantidad de SSV de cada grupo, en vez de toda la biomasa (SSV_T). Desarrollar un *proxy* que permita determinar los distintos grupos metanogénicos en función de los SSV es aún un gran desafío para el área de la digestión anaerobia.

Por otro lado, la técnica de FISH es adecuada para responder este tipo de interrogantes pero nuevamente, presenta sesgos vinculados con la cobertura de la diversidad debido a la especificidad en el diseño de las sondas. Muchos estudios

encuentran una dominancia de arqueas acetoclásticas pero otros de hidrogenotróficas, esto quizás dependa del tipo de sustrato a degradar. Por ejemplo, Nettman *et al.*, 2010 realizó un estudio polifásico en el cual empleó FISH, qPCR y ARDRA del gen *rARN de 16S* en muestras de lodos de seis biodigestores de cultivos energéticos. El autor encontró que cinco de ellos se encontraban dominados por arqueas hidrogenotróficas y solo uno por acetoclásticas.

En esta tesis logramos confirmar los resultados obtenidos mediante qPCR con ensayos de actividad hidrogenotrófica (capítulo 2), aunque quedó pendiente analizar las muestras con la técnica de FISH. Con respecto a las actividades hidrogenotróficas solo fue posible realizar los ensayos con muestras de un reactor de la industria láctea operando de forma estable debido a que el desarrollo y puesta a punto de la técnica fue posterior al muestreo de los reactores piloto. En estos ensayos la actividad hidrogenotrófica fue aproximadamente 1,5 veces la actividad acetoclástica, confirmando dicha vía como dominante y coincidiendo con los resultados de qPCR.

El número de copias por nanogramo de ADN total da cuenta de la proporción relativa de los distintos grupos estudiados en relación a la cantidad total de microorganismos. Aunque también hubiese sido interesante expresarlo por gramo de sólidos suspendidos volátiles (SSV) para poder correlacionarlo con el contenido de sólidos del reactor. Lamentablemente esto no se tuvo en cuenta en el muestreo y no fue posible realizar dicho cálculo. Los SSV son una medida comúnmente empleada para el seguimiento de los reactores anaerobios y se correlaciona de forma directa con la cantidad de biomasa presente en la muestra analizada. Aunque el contenido de SSV no permite conocer qué proporción de estos corresponde al sustrato residual, que en el caso de los reactores de sólidos puede ser importante, ni tampoco discrimina las relaciones entre las distintas poblaciones de microorganismos.

Por ejemplo, dos lodos podrían contener el mismo contenido de SSV pero uno de ellos podría ser mucho más rico en metanogénicos hidrogenotróficos que el otro. En el caso en que se emplean los SSV para estimar la cantidad de biomasa que debe utilizarse en un ensayo de actividad específica acetoclástica, la estimación no sería buena. Entonces, estudiar si es posible reflejar el cambio en la cantidad de número de copias de metanogénicos totales, a través del gen *mcrA* o con el gen rRNA de 16S de los distintos

grupos de arqueas metanogénicas en relación al contenido de SSV en los lodos podría ser una herramienta interesante para conocer las proporciones relativas de los distintos grupos metanogénicos en los distintos lodos, también lo es la estimación del número total de éstos.

Cuando comparamos el número de copias en los tres reactores estudiados encontramos que el orden *Methanobacteriales* fue dominante en todos ellos, seguido del orden *Methanosarcinales*, los cuales se mantuvieron entre uno y dos órdenes de magnitud menor y por último los *Methanomicrobiales*, que se encontraron generalmente entre tres órdenes de magnitud por debajo de los *Methanobacteriales*. Teniendo en cuenta que los *Methanobacteriales* son exclusivamente hidrogenotróficos (sin citocromos) esto indicaría que entonces estos organismos habrían sido los dominantes en los tres reactores.

Los *Methanosarcinales* (con citocromos) por su parte fueron en su gran mayoría pertenecientes a la Familia *Methanosaetaceae*, organismos exclusivamente acetoclásticos (Material suplementario capítulo 2), por lo que entonces podríamos afirmar que los *Methanosarcinales* estarían representados en su mayoría por organismos acetoclásticos pero que serían menos abundantes que sus compañeros hidrogenotróficos. Asimismo, los *Methanococcales* estuvieron por debajo del límite de detección, lo que indicaría una ausencia de este grupo. En el reactor de la industria láctea que operaba de forma estable y tenía más historia (8vo año de operación) la cantidad de copias.ng ADN⁻¹ fue superior a la de los dos reactores en fase de arranque. El mayor número de metanogénicos reflejaría la adaptación luego de un período considerable de operación.

Los organismos hidrogenotróficos además de ser más resistentes a condiciones ambientales adversas, también se duplican más rápido que sus compañeros acetoclásticos (Thauer *et al*, 2008), lo que concuerda con encontrar este tipo de estructura, en la cual los individuos hidrogenotróficos superan en número a los acetoclásticos. Ahora bien, estos resultados basados en el número de copias de un gen -y aunque éste sea un marcador molecular-, no es prueba directa de la vía metanogénica dominante. Los hidrogenotróficos pueden ser más pero menos eficientes para producir metano. En la bibliografía algunos trabajos discuten esto en base a organismos aislados, aunque aún se está lejos de conocer la cinética de los distintos microorganismos en las condiciones reales presentes en un reactor.

Como se mencionó anteriormente una forma de acercarnos a la respuesta a este problema durante la tesis fue realizando ensayos de actividad acetoclástica e hidrogenotrófica, en los cuales confirmamos los resultados genéticos. También es cierto que por un desfase entre el muestreo y el desarrollo de la técnica, solo pudimos realizar los ensayos de la actividad hidrogenotrófica para el reactor lácteo que operaba de forma estable y estos resultados se extrapolaron a los dos reactores en fase de arranque. Aunque, para obtener resultados más conclusivos, se debería repetir este abordaje polifásico en varios lodos de distintos orígenes.

Una observación importante fue la estabilidad en la estructura de las tres comunidades metanogénicas en el tiempo a pesar de las perturbaciones que se dieron en ambos reactores piloto, a saber, un cambio brusco en el pH en el reactor lácteo y el período interzafral sin alimentación, en el reactor de vinaza. En general, varios estudios concuerdan en que frente a condiciones estresantes como eventos de sobrecarga del sistema (shock de OLR), disminución de los TRH, variaciones en la temperatura, e incrementos en la concentración de amonio o AGCL, se promueve la dominancia de organismos *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae* y *Methanosarcina*. Como consecuencia se da un cambio de la metanogénesis acetoclástica a la oxidación sintrófica de amonio (SAO) y la metanogénesis hidrogenotrófica (Carballa et al., 2015).

Los resultados obtenidos en los tres reactores mostraron que las comunidades no fueron dinámicas sino más bien estables, manteniendo no solo la estructura sino la cantidad de individuos, en términos de números de copias.ng ADN total¹. Con respecto a la estabilidad de las comunidades metanogénicas, Lee *et al.*, 2009 observó comunidades dinámicas con un consumo de acetato diauxico en tres reactores a escala de laboratorio. Los autores correlacionaron el comportamiento diauxico a un cambio de la vía metanogénica acetoclástica a hidrogenotrófica. Empleando la misma técnica que en esta tesis, McKeown *et al.*, 2012 también cuantificó las arqueas metanogénicas en un reactor de laboratorio en condiciones de psicofilia y encontró que la comunidad fue dinámica durante la adaptación a las bajas temperatura y luego se mantuvo estable. Por otro lado, Song *et al.*, 2010 estudió un reactor piloto que trató efluente porcino, encontrando una comunidad metanogénica bastante estable y dominada por organismos hidrogenotróficos.

En el trabajo preentado en esta tesis, la estabilidad de las comunidades

metanogénicas se dio a nivel de órdenes, es decir, a niveles altos de jerarquía taxonómica. Sin embargo, estos resultados no excluyen la hipótesis de que igualmente se haya dado una sucesión de especies de metanogénicos durante el período analizado. Debido las características de la técnica escogida, no es posible obtener este tipo de información, para ello se tendría que haber realizado un análisis basado en secuencia. En consecuencia, la pregunta acerca de la sucesión de especies dentro de cada orden de metanogénicos queda abierta. Finalmente, la estrategia de analizar varias muestras el tiempo aporta una nueva dimensión, permitiendo observar la dinámica de la comunidad. De cualquier modo, no se observó un cambio de vía metanogénica como en los reactores a escala de laboratorio citados anteriormente.

Por otro lado, cuando observamos los resultados de la cuantificación del gen *mcrA*, se observó una correlación interesante con el contenido total de biomasa (SSV) dentro del reactor que trató vinasa, lo que estaría indicando que este gen reflejaría la cantidad de metanogénicos de forma robusta. Sin embargo, esta correlación no se observó en el reactor de efluente lácteo, pero como se mencionó anteriormente, el contenido en grasa adsorbida al lodo y la pérdida de éste por “trituration” quizás hayan enmascarado dicha correlación. Asimismo, la cuantificación de dicho gen también se correlacionó con la actividad metanogénica específica pero en el reactor de efluente lácteo y no en el de vinasa. *A priori* no encontramos hipótesis que expliquen estos resultados contradictorios, por lo que queda abierta la interrogante en este trabajo. En el futuro se deberán realizar ensayos diseñados específicamente para determinar la correlación entre el número de copias del gen *mcrA* con los sólidos y las actividades metanogénicas específicas.

5.4 Bacterias presentes en los reactores: estructura y funciones potenciales

La diversidad de bacterias en los dos reactores en fase de arranque se estudió a través del análisis de secuencias del gen *rARN de 16S*, empleando una plataforma de secuenciación masiva. Este abordaje permite ampliar enormemente el conocimiento de la diversidad presente en cada muestra analizada, en comparación con aquella obtenida empleando métodos basados en cultivos de microorganismos (Harwani, 2013). Esta brecha se vuelve aún más profunda, cuando se trata de microorganismos anaerobios, dadas las dificultades de su manipulación y cultivo.

En esta tesis se logró describir en profundidad la riqueza de taxones presentes en los dos reactores, clasificándolos en tres categorías, abundantes ($\geq 1\%$), en baja abundancia ($1\% \geq x \geq 0,01\%$) y raros ($\leq 0,01\%$). En ambos reactores se observó una tendencia similar, al comienzo los lodos se componían de una gran cantidad de taxones en bajas abundancias y raros pero a medida que avanzaba el tiempo, se seleccionaban algunos grupos que se volvían dominantes.

Esta observación además conduce a pensar que las estructuras de las comunidades de microorganismos en las lagunas anaerobias serían distintas a la de los reactores. Una estructura con mayor diversidad de taxones en baja abundancia podría caracterizar las lagunas. En estos sistemas el tiempo en que el efluente permanece dentro de la laguna y por ende, en contacto con los microorganismos es largo (tiempo de residencia hidráulico alto), lo que genera condiciones ambientales para sostener el crecimiento de varios grupos de microorganismos. En cambio, cuando ese lodo se transfiere a otro sistema, como un reactor UASB, los tiempos de residencia hidráulicos disminuyen de forma importante. La estructura de la comunidad cambiaría a una nueva configuración en la cual un grupo de pocos taxones se volverían dominantes por tener la capacidad de metabolizar rápidamente las crecientes concentraciones de sustrato que ingresan al sistema (a través del aumento de caudal del efluente). Aquellos grupos sin la ventaja de poseer la vía metabólica y/o enzimática para degradar el sustrato presente en el efluente quedarían limitados en su capacidad de proliferar y se mantendrían en baja abundancia o desaparecerían de la comunidad.

En resumen, la equitatividad -entendida como el grado de igualdad de la distribución de la abundancia relativa- de la comunidad disminuiría por efecto de la disminución del tiempo de residencia celular e hidráulico, mientras que los grupos que se volverían dominantes serían determinados por la composición de sustratos presentes en el efluente. La combinación de estos dos factores sería el efecto más importante que moldearía la estructura de las comunidades de bacterias.

De todos modos, la hipótesis que se presentó en los párrafos anteriores podría explicar la dinámica de las comunidades en los dos casos estudiados pero sería difícil de generalizarla a todos los reactores. Por ejemplo, el tipo de lodo de partida en este estudio fue rico desde el punto de vista de los grupos taxonómicos presentes, y eso en gran medida

pudo haber sido consecuencia de que el efluente (frigorífico vacuno) que trataba esa laguna era rico en una variedad compuestos orgánicos. Por ejemplo, si se hubiese empleado lodo de una laguna adaptada a tratar otro tipo de efluente con una menor riqueza de compuestos orgánicos o una mayor concentración de inhibidores (p.ej: curtiembre), la comunidades de partida probablemente hubieran sido menos diversas. En consecuencia la probabilidad de contener grupos con capacidades metabólicas para degradar un nuevo efluente disminuirían y quizás el período de adaptación hubiese sido mayor, retrasando el período de arranque del reactor.

La discusión anterior señala entonces la importancia del inóculo en el arranque de los reactores (Demirel, & Scherer, 2008, Regueiro *et al.*, 2012). No es indistinto utilizar cualquier lodo para tratar cualquier tipo de efluente, de hecho si el inóculo se elige teniendo presente su historia, probablemente se puedan acortar los tiempos de adaptación y arranque. Por supuesto que lo ideal sería emplear un lodo ya adaptado, pero cuando se trabaja a escalas industriales muchas veces este objetivo no es posible, por lo que tener presente este aspecto a la hora de inocular un reactor se vuelve clave en la estrategia de arranque.

Otro aspecto interesante que quedó pendiente de estudio en esta tesis fue analizar el efecto de los microorganismos que ingresan a los reactores con la alimentación (efluente) y su adaptación o aporte a las comunidades microbianas presentes en los lodos. En ambos casos el efluente fue acumulado, en tanques pulmones (efluente lácteo) o bien, en lagunas anaerobias (vinaza), siendo probable que se haya producido una fermentación previa del efluente original. Dependiendo del tiempo en que el efluente permanece estacionado, es posible que se desarrollen comunidades de microorganismos capaces de asimilar el efluente y que irían al reactor cuando este es alimentado. Hubiese sido interesante entonces haber incluido muestras del efluente que entraba al reactor en los análisis genómicos para conocer la diversidad taxonómica y un estimado de la carga microbiana de los efluentes.

En los capítulos 3 y 4 se describió en profundidad la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas de cada uno de los reactores en base a la clasificación de secuencias. En términos generales un conjunto de entre 4-6 filos dominaron las comunidades de bacterias, mientras que una cantidad bastante superior (aprox. 30) se encontraron presentes como filos menores. En el capítulo 3, que estudia el reactor de efluente lácteo,

los grupos dominantes que se fueron seleccionando, fueron clasificados dentro de las clases: *Clostridia*, *Synergistia* y *Gammaproteobacteria*, dentro de las cuales destacaron los *Synergistetes* (Figura 5.1). Los *Synergistetes* están presente frecuentemente en reactores anaerobios en bajas abundancias, aunque se han logrado aislar algunos organismos. Entre otras características, los aislamientos se describen como degradadores de aminoácidos, lo que explicaría en gran medida su abundancia en este tipo de efluente, en el cual las proteínas como la caseína, son uno de sus principales componentes.

Las grasas son otro de los componentes mayoritarios del efluente lácteo, los microorganismos que se han descrito como responsables de la degradación de ácidos grasos, generalmente se encuentran en bajas abundancias y pertenecen a la familia *Syntrophomonadaceae* (orden *Clostridiales*) (Hatamoto *et al.*, 2007). En los reactores estudiados, las OTUs clasificadas como *Syntrophomonas* se encontraron en muy bajas abundancias, lo que no explicaría la degradación de la grasa presente en el reactor. La primera hipótesis sería que la OTU más abundante, que llegó a representar el 77%, y que sólo pudo ser clasificada a nivel de orden como *Clostridiales*, representaría al microorganismo que podría estar llevando a cabo esa función. Esta OTU podría representar una cepa no descrita de *Syntrophomonas* o en su defecto, un microorganismo relacionado con la misma función. La otra hipótesis implicaría el efecto de la remoción mecánica de las grasas del reactor, esto disminuiría considerablemente la concentración de grasas en el sistema (aprox. 50%) y por ende la abundancia de los microorganismos que los degradan.

En este escenario, el organismo representado por la OTU más abundante (*Clostridium*) podría estar degradando la lactosa o la caseína del efluente. Lamentablemente la función de este microorganismo que fue el más abundante quedó sin asignar debido a las limitaciones que presenta el análisis de únicamente el gen *rARN de 16S*. Como se presentó en la introducción, para conocer las funciones metabólicas y sus responsables, en profundidad, se debería haber empleado un abordaje de metagenómica, así como ensayos de actividad enzimática lipolítica y proteolítica específicas.

Por otro lado, en el reactor de vinaza la mayoría de los grupos dominantes (*Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Hyd24-12*, *Proteobacteria* y *Synergistetes*) (Figura 5.1) podrían haber sido seleccionados positivamente para degradar los componentes de la vinaza, que serían principalmente azúcares complejos, glicerol, ácidos

orgánicos y compuestos fenólicos (Paturau, 1982). Dentro de estos destacan dos grupos los verrucomicrobios y los *Hyd12-24* que son un grupo de organismos aún no cultivable. Los verrucomicrobios parecen haber tenido un crecimiento explosivo hacia el tercer mes de operación durante la segunda zafra y luego decayeron bruscamente y se mantuvieron en el entorno del 6%.

Luego de analizar los resultados con especial atención en esta muestra, se descartó la hipótesis de que este “estallido” del filo *Verrucomicrobia* haya sido un error o un sesgo de la técnica, debido a que la muestra fue secuenciada empleando dos plataformas de secuenciación distintas (454 e ionTorrent) y en una de ellas se realizó la secuenciación por duplicado, obteniendo en todos los casos resultados similares. Además cuando se compararon los otros grupos dominantes en la muestra (día 334), se observó que ninguno de ellos salió de la tendencia que fue dándose en el tiempo.

A partir de esta confirmación de los datos de secuenciación, se examinaron los datos de operación (aumento de carga orgánica, caudal, tiempo de residencia hidráulico), así como los indicadores de funcionamiento del reactor (pH, ácidos volátiles, actividad metanogénica específica y % de remoción de DQO, entre otros. Ver anexo I) para identificar la causa del crecimiento abrupto, pero no se logró correlacionar con ninguno de los parámetros medidos. Por un lado esto puede interpretarse como que si bien se dio un cambio importante en la comunidad de bacterias, éste fue transitorio, no llegando a ser lo suficientemente importante como para alterar la performance del reactor.

De todos modos, la causa del estallido de *Verrucomicrobium* es otra pregunta intrigante que quedó abierta en este trabajo. No obstante, es relevante destacar que en el trabajo de Martínez *et al.*, (2014) en el cual analizaron una única muestra de un reactor a escala de laboratorio que trató vinasa, también encontraron una alta proporción de este grupo (35%). Si bien, este grupo tiene algunos representantes aislados y más de 20 genomas han sido secuenciados, su función en los reactores anaerobios aún es desconocida. Originalmente se conocía su participación en el ciclo del carbono como organismos metilótrofos pero no fue sino hasta hace un par de años que se demostró su función de importantes degradadores de polisacáridos de origen vegetal como mucopolisacáridos, celulosa y hemicelulosa, en ecosistemas acuáticos naturales (Martínez-García *et al.*, 2012). Las especulaciones acerca de qué funciones estaría llevando a cabo

este grupo en el reactor entonces podría ser análoga a la de los sistemas naturales y actuarían como hidrolíticos de los polisacáridos de origen vegetal presentes en el efluente. Esto sería concordante con su alta abundancia que en promedio fue de 6%, exceptuando el pico que alcanzó un 46%.

Otro hallazgo sobresaliente en el reactor que trató vinaza fue la cantidad de grupos no cultivables pertenecientes a filos candidatos. Esto podría ser consecuencia de la naturaleza “tóxica” de la vinaza que contiene compuestos recalcitrantes fenólicos de difícil degradación que a su vez, seleccionaría metabolismos y grupos microbianos aún no conocidos con la capacidad de sobrevivir a esas condiciones.

Como se discutió en el capítulo 4 el filo *Hyd 12-24* fue uno de los más abundantes y ha sido recientemente estudiado en profundidad. Este grupo fue postulado como acidogénico, fermentando azúcares y formando acetato e hidrógeno como productos, por lo que probablemente estarían cumpliendo esta función en el reactor. Nuevamente, la mayoría de los grupos dominantes estuvieron vinculados a la degradación de polisacáridos de origen vegetal como la celulosa, hemicelulosa y mucopolisacáridos presentes en la vinaza de caña de azúcar.

Tabla 5. 2. Clasificación funcional de algunos de los filos dominantes en los reactores estudiados según Carballa *et al.*, 2015.

	Hidrolítico	Sintrófico	Metanogénico	Resistente	Resiliente	Redundante
<i>Firmicutes</i>	X	X		X		X
<i>Chloroflexi</i>	X	X		X		
<i>Synergistetes</i>		X			X	X
<i>Hyd 24-12</i>		X			X	
<i>Proteobacteria</i>		X		X		X
<i>Verrucomicrobia</i>	X	X			X	
<i>Methanobacteriales</i>			X	X		

Tomando el esquema de clasificación de la comunidad microbiana anaerobia presentado en la introducción (Carballa *et al.*, 2015), se podrían agrupar los distintos grupos taxonómicos dentro de cada reactor en tres categorías, resistentes, resilientes y redundantes. En la Tabla 5.1 se resumen los principales filos encontrados en los reactores

estudiados y su posible clasificación.

Los resultados encontrados en esta tesis estarían en concordancia con lo que propone Carballa *et al.*, (2015) y que postula que la comunidad de bacterias estaría determinada principalmente por la composición del efluente, mientras que la comunidad metanogénica estaría determinada por otros parámetros como la concentración de AGVs, o las concentraciones de amonio dentro del reactor. Es importante entonces hacer énfasis en la selección de grupos que se da en función del tipo de efluente que se va a tratar, durante la etapa de arranque del reactor.

Esta idea fue particularmente evidente en este trabajo, en el cual ambos reactores se inocularon con lodo proveniente de la misma laguna anaerobia pero divergieron en la abundancia de los grupos dominantes. Por un lado, la estabilidad del lodo en la laguna se observó comparando las dos muestras correspondientes a la inoculación y la reinoculación del reactor lácteo. Y por el otro, el perfil de los grupos presentes en la primer muestra del reactor de vinaza coincidió con aquellos encontrados en el inóculo del reactor lácteo a nivel de filos. Por lo que podríamos asumir que ambos reactores partieron de un inóculo similar y evolucionaron de acuerdo a las restricciones ambientales impuestas en cada caso por la composición del efluente.

5.5 Correlaciones entre parámetros de operación y grupos microbianos

Uno de los objetivos originales de la tesis fue el de buscar correlaciones y entre los distintos parámetros de operación y variables de respuesta, con la composición de las comunidades microbianas. Este objetivo se cumplió parcialmente debido a que no se encontraron correlaciones que pudieran sugerir alguna relación de causa-efecto. En general, las variables microbiológicas como los distintos grupos de arqueas no se correlacionaron con los parámetros de operación claves como la carga orgánica aplicada o el tiempo de residencia hidráulico (ver anexo I).

De hecho, las distintas variables microbiológicas se correlacionaron entre sí y lo mismo sucedió con las variables de operación. Quizás estos resultados hayan sido producto de la diferencia de escalas entre los dos tipos de abordaje. Por ejemplo, la concentración de ADN de las extracciones fue expresada en $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y no se correlacionó con los sólidos

suspendidos volátiles dentro del reactor, que se expresaron en una escala varios órdenes de magnitud mayor como g.L^{-1} . Este resultado no sería esperable ya que ambos proxys dan cuenta de la biomasa presente en las muestras pero nuevamente la diferencia de escalas podría estar enmascarando las posibles correlaciones. El mismo argumento podría aplicarse a todas las variables obtenidas por biología molecular como número de copias o secuencias del gen *rARN de 16S*.

Las principales dificultades que se identificaron con los datos y que impidieron establecer correlaciones matemáticas robustas fueron: las diferencias de escala de las variables medidas, la baja cantidad de muestras analizadas y algunas variables con algunos datos faltantes. Por otro lado, también se identificó la falta de algunos datos confiables como las medidas de los volúmenes de biogás en los rectores, la falta de control sobre el sistema por tratarse de una escala piloto-industrial, una gran variabilidad consecuencia del estado transitorio del reactor que quizás enmascaró posibles correlaciones.

Como se discutió anteriormente, en el único caso en el que se observó una buena correlación fue con la abundancia del gen *mcrA* y el contenido de sólidos dentro del reactor de vinaza. Este resultado reflejó el crecimiento de las arqueas metanogénicas dentro del reactor, aunque ésta correlación no fue confirmada en el reactor de efluente lácteo por lo que el resultado no sería concluyente.

En un trabajo reciente Zhang *et al.*, (2014) estudió las secuencias de *rARN de 16S* obtenidas a partir de librerías de clones de 78 digestores anaerobios publicados en distintos trabajos. Uno de los resultados más relevantes del trabajo fue que el tipo de efluente ejerce un efecto de magnitud superior a las condiciones de operación. Y que por lo tanto el análisis de la variación del tipo de sustrato y de las variables de operación requerirían un número de muestras particularmente alto para elucidar patrones. De hecho proponen que los estudios futuros requerirán de herramientas estadísticas poderosas para analizar los metadatos de cientos de muestras, provenientes de diseños experimentales con varios bioreactores en series temporales.

Asimismo, Regueiro *et al.*, (2014) demostró el efecto de distintos sustratos en la composición de las comunidades microbianas durante el arranque y operación estable de reactores anaerobios de sólidos a escala de laboratorio. La autora concluye también que la

historia del inóculo es importante para lograr una respuesta flexible a perturbaciones operacionales.

Por otro lado, de Vrieze *et al.*, (2016) estudió cuatro reactores de sólidos a escala real, funcionando de forma estable y empleando un abordaje muy similar al utilizado en este trabajo. El autor propone que las comunidades microbianas estarían en constante evolución en el tiempo, independientemente de las condiciones operacionales. En dicho trabajo, también concluye que las comunidades microbianas serían únicas a nivel de OTUs dentro de cada reactor a pesar de tener una composición similar a nivel de filos. En esta tesis se analizaron los sets de datos de secuencias por separado pero quedó pendiente el análisis bioinformático de todas las secuencias obtenidas, para poder determinar si la singularidad a nivel de OTUs que observó de Vrieze *et al.*, (2016), también se cumple en estos reactores.

5.6 Conclusiones

Las comunidades de bacterias en los reactores estudiados desde su arranque - efluente lácteo y vinaza- tuvieron comunidades diversas en un comienzo, que luego cambiaron su estructura, como consecuencia de su adaptación al tipo de efluente que trataron. En ese sentido, la composición del efluente habría sido más importante que las condiciones de operación impuestas, para moldear la estructura de la comunidad de bacterias. Los resultados de la dinámica de los grupos bacterianos podrían resumirse entonces bajo la hipótesis del microbiólogo Baas Becking (1934) que postula que “Todo está en todas partes, pero el ambiente selecciona”.

En ambos reactores dominaron los mismos filos, aunque en distintas proporciones. Los filos *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Synergistetes* y *Verrucomicrobia*, junto con *can. phyl*, *Hyd 24-12* fueron los grupos dominantes luego de la adaptación al efluente. Los *Clostridiales* fueron un grupo resistente y los *Synergistetes* fueron un grupo resiliente frente a una perturbación fuerte en el pH del reactor que trató efluente lácteo. En el reactor de vinaza los *Firmicutes*, *can. phyl*, *Hyd 24-12* y los *Verrucomicrobia* demostraron ser resistentes a la vinaza y a las cargas orgánicas aplicadas. Por otra parte, la detención de la alimentación del reactor durante dos períodos de aproximadamente cinco meses no afectó a la comunidad microbiana que permaneció en un estado de latencia.

Asimismo, se puede concluir que si bien los lodos anaerobios se caracterizan por poseer comunidades de bacterias relativamente diversas y con redundancia funcional en las primeras etapas de la digestión anaerobia, es posible ‘manipular’ dichas comunidades, mediante la operación adecuada de los reactores (ambiente) que las contienen.

En este trabajo se demostró la importancia de los organismos hidrogenotróficos en las comunidades metanogénicas presentes en dos reactores de efluente lácteo y uno que trató vinaza de caña de azúcar, operados en condiciones industriales. Los *Methanobacteriales* fueron el orden hidrogenotrófico más abundante, seguidos del orden *Methanosarcinales* y dentro de éste, la familia acetoclástica *Methanosaetaceae*. A diferencia de las bacterias, las comunidades de arqueas no fueron tan dinámicas, ni se diferenciaron por el tipo de efluente tratado.

En esta tesis queda demostrada la factibilidad de tratar dos efluentes tradicionalmente no tratados con la tecnología anaerobia de degradación de materia orgánica por sus características inhibitorias del proceso. Esto último sería cierto si la operación del reactor no se realizase por personal calificado. En ambos casos la operación de los reactores fue dirigida por Ingenieros Químicos formados en el área de la tecnología anaerobia y los reactores lograron degradar la materia orgánica y producir biogás dentro de los parámetros esperados.

Finalmente, los hallazgos de este trabajo fueron fruto del el estudio integrando de la Ingeniería y la Microbiología, aplicado a los reactores. Sin dicha interacción no hubiese sido posible realizar las experiencias a las escalas en que se trabajó, ni se hubiera conocido la composición taxonómica y la evolución de las comunidades microbianas. Esta tesis profundizó el entendimiento entre las dos áreas del conocimiento, empleando un seguimiento sistemático y a escalas reales.

*“Uno nunca ve lo que se ha hecho,
sino que ve lo que queda por hacer”
Marie Curie*

5.7 Perspectivas

- Continuar la colección de información genética y de operación obtenida de otros reactores anaerobios de efluentes a escala real, para poder profundizar la hipótesis del efecto del efluente sobre la comunidad de bacterias.
- Estudiar el efecto de los microorganismos que entran con la alimentación sobre las comunidades microbianas seleccionadas en reactores de tratamiento de efluentes reales complejos.
- Profundizar el conocimiento de los microorganismos de los filos *Verrucomicrobia* y *Hyd 24-12* en los reactores anaerobios para poder elucidar sus funciones en estos sistemas.
- Debido a que en reactores operados a escala real no es fácil variar las condiciones de operación como el TRH, OLR, pH, etc., sobre todo durante el arranque, es necesario realizar experiencias más controladas y a escala de laboratorio para poder estudiar el efecto de estas variables sobre las comunidades. De esa forma se podría variar una mayor cantidad de parámetros de operación y estudiar su efecto durante el arranque de los reactores.
- Estudiar la composición taxonómica de las comunidades de arqueas presentes en los reactores mediante secuenciación masiva empleando *primers* específicos para arqueas recientemente descritos que tienen una mayor cobertura para las arqueas metanogénicas. De esta forma se podría conocer en profundidad la diversidad y estructura filogenética de dichas comunidades.
- Buscar formas de correlacionar los resultados de real time PCR con datos de biomasa de los reactores expresada en g SSV. Debido a que los SSV es una medida de biomasa muy utilizada para el diseño y operación de reactores es necesario buscar la forma de expresar los datos obtenidos por real time PCR en relación a los gSSV.

- Realizar experiencias utilizando ^{14}C marcado para poder confirmar si la mayoría de la metanogénesis ocurre por la vía hidrogenotrófica. De esta manera se podrían confirmar los resultados obtenidos de cuantificación de genes y de actividad metanogénica.
- Determinar el nivel de expresión de los genes de arqueas metanogénicas para evaluar cuál de las vías sería la más activa. Para ello se podría utilizar técnicas de metatranscriptómica que si bien presentan varias dificultades y aún son técnicas muy costosas, se ha avanzado mucho en su optimización en los últimos años.

5.8 Referencias

- Alves, M.M., Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Cavaleiro, A.J., Picavet, M., Smidt, H., Stams, A.J. (2009). Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long-chain fatty acids (LCFA). *Microb Biotechnol*, 2(5), 538-550.
- Baas, Becking., L.G.M. (1934). Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Carballa, M., Regueiro, L., Lema, J.M. (2015). Microbial management of anaerobic digestion: exploiting the microbiome-functionality nexus. *Curr Opin Biotechnol*, 33, 103-111.
- Demirel, B., Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Bio/Technol*, 7(2), 173-190.
- De Vrieze, J., Raport, L., Roume, H., Vilchez-Vargas, R., Jáuregui, R., Pieper, D.H., Boon, N. (2016). The full-scale anaerobic digestion microbiome is represented by specific marker populations. *Water Res*, 104, 101-1.
- Fernández, A. (2016). Puesta en marcha de un reactor UASB modificado para el tratamiento de efluente lácteo (Tesis de Maestría en Ing. Quim.). Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Uruguay.
- Fotidis, I.A., Karakashev, D., Kotsopoulos, T.A., Martzopoulos, G.G., Angelidaki, I. (2012). Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiol Ecol*, 83(1), 38-48.
- Harwani, D. (2013). The great plate count anomaly and the unculturable bacteria. *Microbiology*, 2(9).
- Hatamoto, M., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H. (2007). Identification and cultivation of anaerobic, syntrophic long-chain fatty acid-degrading microbes from mesophilic and thermophilic methanogenic sludges. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), 1332-1340.
- Jeris, J.S., McCarty, P.L. (1965). The Biochemistry of Methane Fermentation Using ^{14}C Tracers. *J Water Poll Control Fed*, 37(2), 178-192.
- Karakashev, D., Batstone, D.J., Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 331-338.
- Lee, C., Kim, J., Hwang, K., O'Flaherty, V., & Hwang, S. (2009). Quantitative analysis of methanogenic community dynamics in three anaerobic batch digesters treating different wastewaters. *Water Research*, 43(1), 157-165.
- López, I., Borzacconi L. Passeggi, M. (2016). Presentación oral. Start-up and performance of a real scale anaerobic reactor treating vinasse. En: XII DAAL Congreso Latinoamericano de Digestión Anaerobia ,Cuzco, Perú.
- McKeown, R. M., Scully, C., Enright, A. M., Chinalia, F. A., Lee, C., Mahony, T., ... & O'flaherty,

- V. (2009). Psychrophilic methanogenic community development during long-term cultivation of anaerobic granular biofilms. *The ISME journal*, 3(11), 1231-1242.
- Martínez, M. A., Romero, H., & Perotti, N. I. (2014). Two amplicon sequencing strategies revealed different facets of the prokaryotic community associated with the anaerobic treatment of vinasses from ethanol distilleries. *Biores Technol*, 153, 388-392.
- Martinez-Garcia, M., Brazel, D.M., Swan, B.K., Arnosti, C., Chain, P.S., Reitenga, K.G., ... & Thompson, B. (2012). Capturing single cell genomes of active polysaccharide degraders: an unexpected contribution of Verrucomicrobia. *PLoS One*, 7(4), e35314.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Pramschüfer, S., Mundt, K., Plogsties, V., Herrmann, C., Klocke, M. (2010). Polyphasic analyses of methanogenic archaeal communities in agricultural biogas plants. *Appl Environ Microbiol*, 76(8), 2540-2548.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A. (1994). Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 60(4), 1241-1248.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Alonso-Gutierrez, J., Stams, A. J., Lema, J. M., & Carballa, M. (2012). Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol Res*, 167(10), 581-589.
- Regueiro, L., Veiga, P., Figueroa, M., Lema, J.M., Carballa, M. (2014). Influence of transitional states on the microbial ecology of anaerobic digesters treating solid wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(5), 2015-2027.
- Schnürer, A., Zellner, G., Svensson, B.H. (1999). Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol Ecol*, 29(3), 249-261.
- Song, M., Shin, S. G., & Hwang, S. (2010). Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), S23-S28.
- Passeggi, M., López, I. Borzacconi, L. (2009). Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge. *Water Sci Technol* 59(3): 501 – 506.
- Paturau, J. M. (1982). *By-products of the Cane Sugar Industry: An Introduction to Their Industrial Utilization (Sugar Series-3)*. Elsevier Scientific Pubs.
- Thauer, R.K., Kaster, A.K., Seedorf, H., Buckel, W., Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, 6(8), 579-591.
- Westerholm, M., Dolfing, J., Sherry, A., Gray, N.D., Head, I.M., Schnürer, A. (2011). Quantification of syntrophic acetate-oxidizing microbial communities in biogas processes. *Environ Microbiol Rep*, 3(4), 500-505.
- Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J. M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass Bioenerg*, 19(2), 63-102.

Williams, J., Williams, H., Dinsdale, R., Guwy, A., Esteves, S. (2013). Monitoring methanogenic population dynamics in a full-scale anaerobic digester to facilitate operational management. *Biores Technol*, 140, 234-242.

Zhang, W., Werner, J.J., Agler, M.T., Angenent, L.T. (2014). Substrate type drives variation in reactor microbiomes of anaerobic digesters. *Biores Technol*, 151, 397-401.

ANEXO I

DATOS

Al.I Reactor efluente lácteo

Tabla Al.I a. Datos de operación efluente lácteo

Días	Fecha	AME (kgDQO/kgSSV.d)	Ali (kgDQO/kgSSV.d)	SSV G1 (g/l)	IVL (mL/gSSV)	Granulom	Bv (kgDQO/m3/d)	TRH (d)	CH4 (%)	Lodo m(g)	ADN (ug/mL)	ADN (ug/mL.g lodo)	qPCR (8 Probes)	Observaciones	
0	15/02/2012	**	**	**	**	**	**	**	**	58,3	0,263	4,511	+		
	13/03/2012	**		0,056	30,19	**	**	**	**	**	**	**	**		
0	26/03/2012	0,22		0,0473	32,22	31,0	**	**	**	64,3	0,173	2,691	+		
14	09/04/2012	0,2		0,039	30,10	33,2	**	1,1	0,16	**	66,8	0,136	2,036	+	
29	24/04/2012	0,27	**		13,6	65,5	+	1	0,08	70	**	**	**	**	
35	30/04/2012	0,26		0,0301	24,52	40,7	+	1,6	0,06	72	67,7	0,169	2,496	+	
49	14/05/2012	**	**		26,00	38,5	+	4,6	0,04	67	91	0,381	4,196	+	
63	28/05/2012	0,27		0,0577	22,06	43,4	+	**	0,04	72	99	0,471	4,772	+	
77	11/06/2012	0,23	**		21,15	47,3	+	**	0,04	76	100	0,302	3,020	+	
91	25/06/2012	0,38		0,0756	22,20	45	+	5,6	0,05	76	**	**	**	**	Parada mantenimiento pirosecuenciación T1 semana 2/7 pulso de soda, el pH llegó a 9 dentro del reactor
105	09/07/2012	0,1	**		23,45	41,2	+	**	**	68	73	0,395	5,418	+	
126	30/07/2012	0,17	**		33,28	29,04	**	0,7	0,1	**	70	0,291	4,145	+	
104	13/08/2012	0,16		0,082	28,74	34,8	+	0,9	0,1	75	**	**	**	**	
154	27/08/2012	0,21	**		25,5	39,1	+	2,3	0,05	64	70	0,305	4,345	+	pirosecuenciación T1
169	11/09/2012	0,21		0,152	16,83	**	+	**	0,06		98	0,496	5,056	+	
182	24/09/2012	0,2	**		29,6	29,6	+	1,8	0,05	78	**	**	**	**	
196	08/10/2012	0,26	**		51,4	51,4	+	2,5	0,05	58	92,5	0,673	7,276	+	
217	29/10/2012	0,2		0,162	29,8	29,8	+	**	0,03	**	**	**	**	**	Parada mantenimiento, arrancó el 1
260	10/12/2012	0,26	**		29,7	29,7	**	**	**	**	48	0,329	6,812	+	
288	07/01/2013	0,21	**		30,5	30,5	**	1,9	0,03	**	55,6	0,299	5,378	+	reinoculación
337	25/02/2013	**	**	**	**	**	**	**	**	**	48	0,309	6,384	+	Detenido

Tabla AI.I b. Ácidos grasos volátiles, efluente lácteo.

FECHA	Día	Peso Molecular(g/mol)									AGV totales (ppm HAc)
		60	72	88	88	102	102	116	116	130	AGV totales
		Concentración (ppm HAc)									
		Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	Isocapróico	Capróico	Heptanóico	
15/02/2012	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	55
26/03/2012	1	52	0	0	0	0	0	0	0	0	52
09/04/2012	14	52	0	0	0	0	0	0	0	0	52
30/04/2012	35	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
14/05/2012	49	66	0	0	0	0	0	0	0	0	66
28/05/2012	63	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
11/06/2012	77	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
06/07/2012	105	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
30/07/2012	126	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
27/08/2012	154	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
08/10/2012	196	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
10/12/2012	206	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
07/01/2013	288	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
25/02/2013	337	31	0	0	0	0	0	0	0	0	31
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla AI.I c. Composición efluente lácteo.

Fuente: Informe proyecto BIOVALOR, Identificación de residuos en el Uruguay pasibles de ser valorizados por digestión anaerobia y estimación de su potencial de metanización. MGAP, 2015.

Referencia → Componente ↓	Relevamiento DINAMA (2011)				Danalewich <i>et al.</i> (1998)				Demirel <i>et al.</i> (2005), Producto:		
	Promedio	Desv.Est.	Min.	Máx.	Promedio	Desv.Est.	Min.	Máx.	Manteca	Varios	Queso
pH					8.4	1.8	6.2	11.3	8 - 11	6 - 11	5.5 - 9.5
DQO (g/L)	3.2	2.4	0.7	11.0	2.9	1.6	0.8	7.6	2 - 6	1.2 - 9.2	1.0 - 7.5
DBO5 (g/L)	1.7	1.4	0.3	6.9	1.9	1.3	0.6	5.7	1.2 - 4.0		0.6 - 5.0
Sólidos totales (g/L)					4.5	3.1	1.8	14.2		2.7 - 3.7	
Sólidos volátiles (g/L)					2.8	2.9	562.0	11.0			
Sólidos suspendidos (g/L)	0.8	0.4	0.1	1.5	0.27	0.43	0.03	1.63	0.35 - 1.0	0.34 - 1.73	0.5 - 2.5
Grasas y aceites (g/L)	0.4	0.5	0.03	2.3							
Ácidos grasos volátiles (mg _{HAc} /L)					147	115	< 1	431			
Alcalinidad (mg _{CaCO3} /L)					652	382	225	1550	150 - 300	320 - 970	
Nitrógeno (mg/L)	84	52	14	153	91	39	14	140	50 - 60	14 - 272	
N-amoniaco (mg/L)	22	15	5	53	9	8	1	34			
Fósforo (mg/L)	29	22	7	69	71	40	29	181		8 - 68	
Potasio (mg/L)					47	35	9	156	35 - 40	8 - 160	
Sodio (mg/L)					544	252	263	1265	170 - 200	123 - 2324	720 - 980
Calcio (mg/L)					49	15	1	59	35 - 40	12 - 120	530 - 950
Magnesio (mg/L)					21	12	7	46	5 - 8	2 - 97	

Tabla A1.1 d. Composición de los principales componentes de la leche.

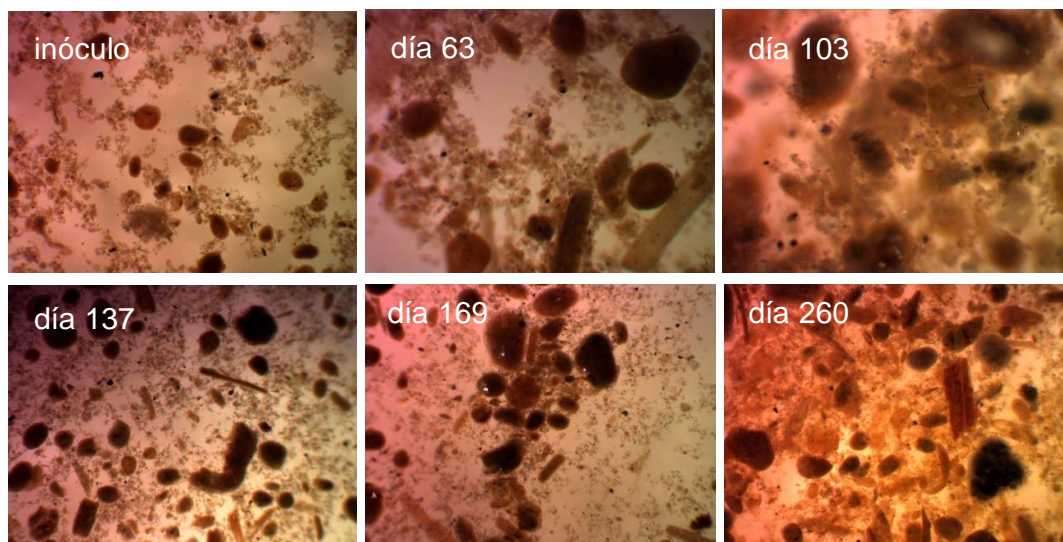
Fuente: O Moreiras, A Carbajal, L Cabrera, C Cuadrado. Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide. Madrid. 2001

Agua	Proteínas	Lípidos	Glúcidos	Minerales
88	3,2	3,4	4,7	0,7

Proteínas	g/l	Azúcares	g/l
Totales	3,2-3,3	Lactosa	37-54
Caseína	2,5-3,0	Glucosa	7,4
En suero*	5,0-6,5	Galactosa	2

* principalmente albúmina y globulina

Figura A1.1 a. Fotografías del lodo proveniente del reactor de efluente lácteo en los días 14/03/12 (inóculo), 28/05/12 (día 63), 06/07/12 (día 103), 10/08/12 (día 137), 11/09/12 (día 169) y 10/12/12 (día 260). El aumento del objetivo se indica en cada foto Aumento ocular: 10



AI.II Reactor de vinasa

Tabla AI.II a.. Datos de operación reactor vinasa.

Días	Fecha muestreo	Lodo (g)	AME G1 (kgDQO/kgSSV.d)	SSV			Bv (kgDQO/m3/d)	TRH (d)		Lodo m(g)	ADN (ug/mL)	ADN (ug/mL.g lodo)	qPCR (8 Probes)	Observaciones	
				G1 (g/l)	IVL (mL/gSSV)			CH4							
8	18/10/2011	nd	0,13	6,8	**		1,09	8,6	74%	**	**	**	**		
15	25/10/2011	nd	0,08	6,6		140,8	3,34	8,6	75%	48,0	0,314	6,542	+		
23	02/11/2011	nd	0,11	10,3		182,5	3,25	8,6	70%	**	**	**	**		
28	07/11/2011	nd	0,14	24		95,1	1,36	8,6	69%	**	**	**	**		
35	14/11/2011	nd	0,11	19,7		160,2	2,45	8,6	66%	50,9	0,561	11,022	+		
57	06/12/2011	nd	0,06	9,9		99,0	1,11	8,6	65%	60,0	0,046	0,763	+	1 semana sin alim.	
63	12/12/2011	nd	0,09	19,7		99,0	2,88	8,6	65%	**	**	**	**		
271	25/06/2012	nd	0,08	20,1		49,7	1,21	16,3	**	53,0	0,171	3,226	+	1er día operación, 2do año	
281	05/07/2012	20	0,06	8,6		140,9	5,39	7,8	72%	49,2	0,207	4,207	+		
292	16/07/2012	20	0,24	27,1		36,9	Nd	nd	73%	91,3	0,265	2,903	+	s/alim	
306	30/07/2012	15	0,35	24,2		41,3		1,76	18,5	70%	55,8	0,291	5,215	+	50% dil
320	13/08/2012	15	0,36	21,8		45,8		2,61	12,5	69%	61,3	0,414	6,754	+	batch
334	27/08/2012	10	0,4	23,5		42,7		2,89	15,5	65%	57,5	0,730	12,696	+	batch/Pirosecuenciación
356	18/09/2012	10	0,3	36		27,7		4,03	9,2	74%	59,6	0,529	8,876	+	batch
369	01/10/2012	10	0,24	14,6		67,9		5,17	7,7	74%	67,7	0,460	6,795	+	s/alim
383	15/10/2012	10	0,21	20,1		49,7	**	**	**	57,0	0,403	7,070	+	final de la zafra y operación	
439	10/12/2012	13	0,13	36,1	**	**	**	**	**	59,5	0,200	3,361	+	período de parada Nosepudo hacer IVL porque no hay sobrenadante y el lodo es un gel	
531	11/03/2013	11	0,1	48,5	**	**	**	**	**	64,6	0,151	2,337	+		

Tabla A1.II b. Ácidos grasos volátiles

FECHA	Día	Peso Molecular (g/mol)							AGV totales (ppm HAc)			AGV totales		
		60	72	88	88	102	102	116	116	130	Acético		Propiónico	Heptanóico
24/10/2011	0			57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57
20/11/2011	35			145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	145
07/12/2011	57			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/06/2012	271			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
05/07/2012	281			0	412	0	0	0	0	0	0	0	0	412
19/07/2012	292			85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
25/07/2012	306			58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58
30/07/2012	320			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13/08/2012	334			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27/08/2012	356			764	0	0	0	0	0	0	0	0	0	764
24/09/2012	383			0	754	0	29	0	0	0	0	0	0	783
28/09/2012	387			0	77	0	0	0	0	0	0	0	0	77
01/10/2012	390			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/10/2012	405			116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	116
10/12/1112	461			46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	46
13/03/2013	555			152	0	0	0	0	0	0	0	0	0	152

Tabla AI.II cTabla AI.IIc. Composición distintas vinastas.

Fuente: España Gamboa *et al.*, 2011. Waste Management & Research 29(12) 1235–1250

	Sugar source					
	Cane juice	Cane molasses	Grapes (wine)	Agave (tequila)	Sweet sorghum	Beet molasses
BOD (g L ⁻¹)	16.7	39.5	14.54–16.3	20.6	46	27.5–44.9
COD (g L ⁻¹)	30.4	84.9–95	26–50.2	55.2–66.3	79.9	55.5–91.1
N _T (mg L ⁻¹)	102–628	153–1230	104.9–650	na	800	1800–4750
P _T (mg L ⁻¹)	71–130	1–190	65–118.4	41	1990	160–163
K (mg L ⁻¹)	1733–1952	4893–11000	118–800	240–345	na	10000–10030
S _T (mg L ⁻¹)	1356	1500–3480	120	780–880	na	3500–3720
pH	4.04–4.6	4.46–4.8	3–4.2	3.4	4.5	4.3–5.35
Cu (mg L ⁻¹)	4	0.27–1.71	0.2–3.26	0.36–4	37	2.1–5*
Cd (mg L ⁻¹)	na	0.04–1.36	0.05–0.08	0.01–0.2	na	<1*
Pb (mg L ⁻¹)	na	0.02–0.48	0.55–1.34	0.065–0.5	na	<5*
Fe (mg L ⁻¹)	16	12.8–157.5	0.001–0.077	35.2–45	317	203–226*
Phenols (mg L ⁻¹)	na	34	29–474	44–81	na	450*
VY(LL _{ethanol} ⁻¹)	13	12–20	11.6	10–12	14.3–16	9–15
Reference	1	2	3	4	5	6

N_T, total nitrogen; P_T, total phosphorus; S_T, total sulfate; VY, vinasse yield; na, data not available.*Unit is mg kg⁻¹.

Reference 1: Baez-Smith (2006); Wilkie et al. (2000); Salomon and Lora (2009); Cail and Barford (1985a).

Reference 2: Baez-Smith (2006); Wilkie et al. (2000); Pathak et al. (1999); Kannan and Upreti (2008); Chindankumar et al. (2009); Hutnan et al. (2003).

Reference 3: Bustamante et al. (2005); Vlyssides et al. (2005); Wilkie et al. (2000).

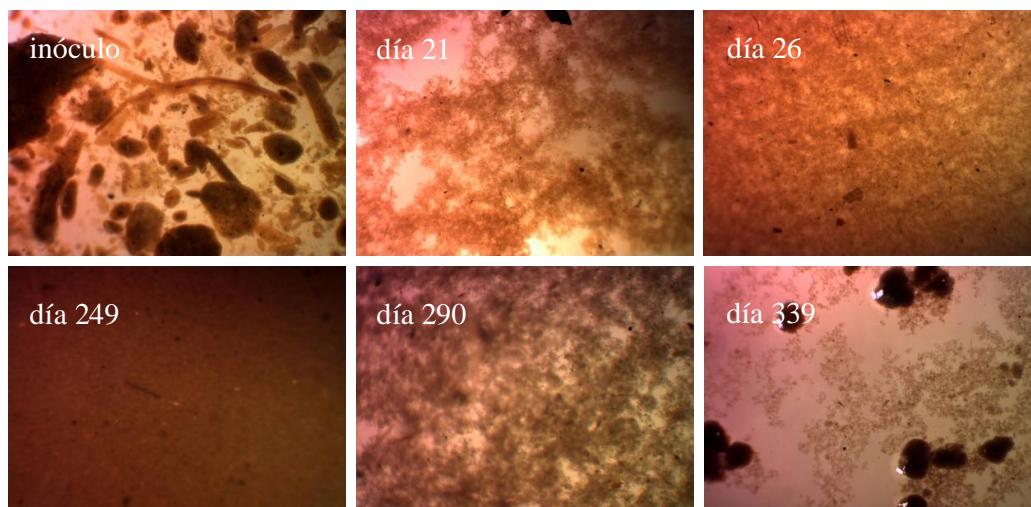
Reference 4: Ilangovan et al. (1997); CIATEJ (2005); Orendain (2006); Mendez-Acosta et al. (2010); Buitrón and Carvajal (2010); López et al. (2010).

Reference 5: Wilkie et al. (2000); Gnansounou et al. (2005); Cail and Barford (1985b).

Reference 6: Wilkie et al. (2000); Jiménez et al. (2006); Hutnan et al. (2003); Decloux et al. (2002); Tejada and Gonzalez (2006); Madejón et al. (2001)

Figura AI. II a. Fotografías del lodo proveniente del reactor de vinaza de los días 28/09/11 (inóculo), 31/10/11 (día 21), 5/12/11(día 26), 16/07/12

(día 249), 27/08/12 (día 290) y 15/10/12 (día 339). Aumento:



AI.III. . Resumen datos de operación de los reactore

Tabla AI.III aTabla AI.III. Resumen datos de operación de los reactores

	V (m ³)	Biomasa (kg)	Carga volumétrica (kg DQO.kg SSV ⁻¹ .d ⁻¹)	Carga específica (kg DQO.kg m ⁻³ .d ⁻¹)	% Biogás	% Remoción DQO	Año
Vinaza	100	400	1,0 - 3,5	0,2 - 0,6	65 - 75	55 - 70	2011
			1,0 - 5,0	0,3 - 0,8	65 - 75	60 - 90	2012
Ef. Lácteo	100	1300	1,5 - 5,6	0,1 - 0,8	65-75	≥85	2012

AI.IV. Análisis de T-RFLPs

AI.IVa. T-RFLPs de bacterias de los dos reactores

En la Figura AI.IVa se muestran los resultados obtenidos para los T-RFLPs de Bacteria para los dos reactores (lácteo y vinasa de caña) analizados con el software T-Rex (sitio web: <http://trex.biohpc.org/>). Cada punto representa una muestra. Los parámetros para construir la matriz de picos fueron los siguientes: i) Noise Filtering (peak height, standard deviation multiplier =2), ii) T-RF Alignment (clustering threshold = 0,5) y eliminar muestras con menos de 20 T-RFs. En la Tabla AI.IX se detallan los resultados obtenidos.

Tabla AI.IV a. Propiedades básicas de la matriz de datos construida con T-Rex

Samples present	23 out of 25
T-RFs present	221 out of 389
Number of column blocks (environments)	22
Numbers of replicates in consecutive environments	1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1
Missing data represented by	-1
Minimum number of T-RFs	24 in sample 39487_24 (A14_CC_001.fsa)
Maximum number of T-RFs	124 in sample 39487_2 (SR2_CC_004.fsa)
Average T-RF richness	71.35
Sample Heterogeneity	2.1
Percent of empty cells in data matrix	67.72

En promedio las muestras tuvieron 71 fragmentos terminales (T-RFs), siendo la muestra A14 (vinasa) la que presentó menor riqueza (24T-RFs) y la SR2 (residuo lácteo) la que presentó mayor riqueza (124 T-RFs). Luego, la heterogeneidad (o diversidad beta) de la muestra fue de 2,1. Según Mc Cune and Grace (2002) cuando se trabaja con datos ecológicos, las diversidades beta son consideradas bajas cuando su valor es menor a 1 y muy altas cuando este valor es superior a 5. Por otro lado, Culman (2008) encontró que en sets de datos de T-RFLPs con diversidades beta superiores a 2 deberían ser analizadas con análisis NMS (Multidimensional Scaling), mientras que aquellos con diversidades menores pueden ser analizados por análisis de ordenación. En este caso como el valor de beta fue muy cercano a 2 realizamos el análisis de ordenación (AMMI2) que ofrece la sitio.

En la Figura AI.III se muestra el biplot del análisis de ordenación obtenido luego de aplicar el modelo AMMI2. Como se observa, el primer componente de interacción (IPC1) separó las muestras según el de reactor estudiado.

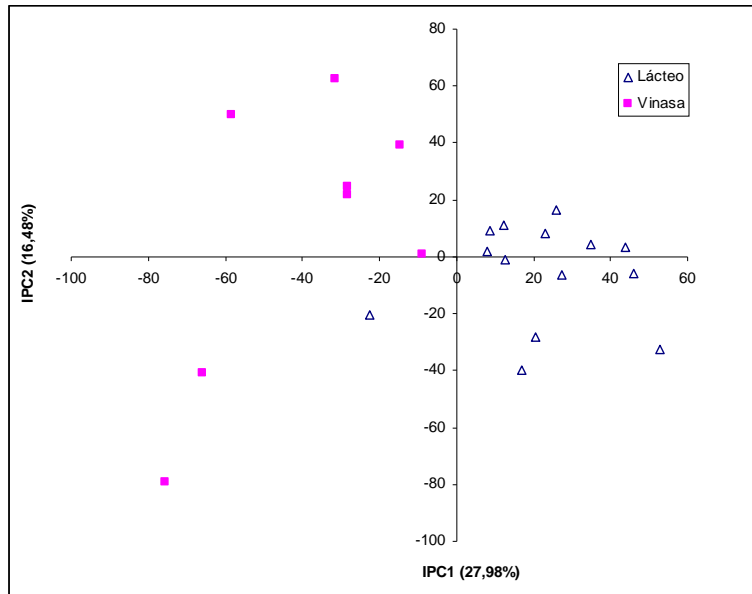


Figura AI.IV a. Biplot de los perfiles de T-RFLPs para cada muestra analizada (puntos) sin réplicas. Los triángulos corresponden a las muestras tomadas del reactor lácteo y los cuadrados a las del reactor de vinasa.

A partir del biplot podría interpretarse que ambos reactores presentaron comunidades de bacterias distintas durante el período de seguimiento, al menos a nivel de perfiles de T-RFLP. Tomando en cuenta que los dos reactores fueron inoculados con el mismo lodo estas diferencias podrían darse a nivel de las especies de los distintos grupos bacterianos o bien podría ser consecuencia del efecto del efluente en la estructura de las comunidades cambiando la riqueza de especies presentes en cada uno. Luego, el IPC2 podría separar las muestras en el tiempo pero este perfil no es claro y precisa mayor análisis de los datos.

De todos modos, la diferencia entre las dos comunidades se observa claramente en el biplot y podría explicarse por distintas causas; la composición del efluente (vinasa o lácteo) o el modo de operación (zafral en el caso de vinasa) o una combinación de ambas. Para intentar definir cual de estos factores determina las diferencias en las comunidades de bacterias, emplearemos la técnica de secuenciación masiva con el objetivo de conocer en profundidad las afiliaciones filogenéticas de las bacterias presentes en cada reactor. De este modo, si los distintos sets de muestras se siguen separando por tipo de reactor podremos sugerir que el tipo de efluente sería el factor determinante en la estructura de las comunidades. En el caso contrario diseñaremos estrategias para estudiar el efecto del modo de operación.

AI.IVb. T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa

Se realizaron T-RFLPs empleando primers para arqueas de distintas en distintas fechas y a distintas alturas (tomas) del reactor. Las alturas fueron señaladas como 1A, 3A, 6A y 7A, siendo la 1A la más cercana al fondo del reactor y la 7A, la más superior. También se analizó una muestra compuesta de todas las tomas. Para cada fecha no se observaron grandes diferencias en los perfiles.

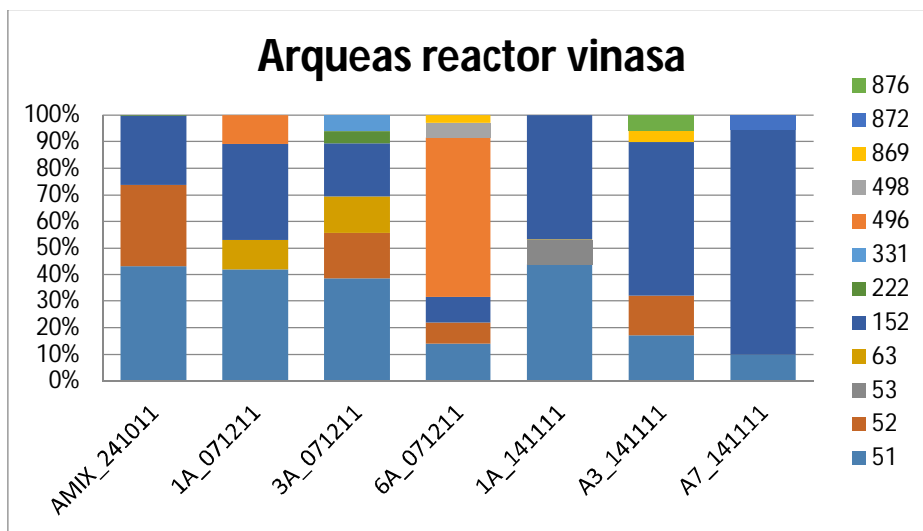


Figura AI.IV b. Periles de T-RFLPs del gen *rARN de 16S* de arqueas para disitntas muestras del eactor de vinasa.

Los perfiles obtenidos se analizaron con el software PAST (sitio web: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>). En la figura AI.V se muestra un dendograma de similtud de las distintas muestras en donode puede observarse una similitud mayor a el 90% en todas las muestras.

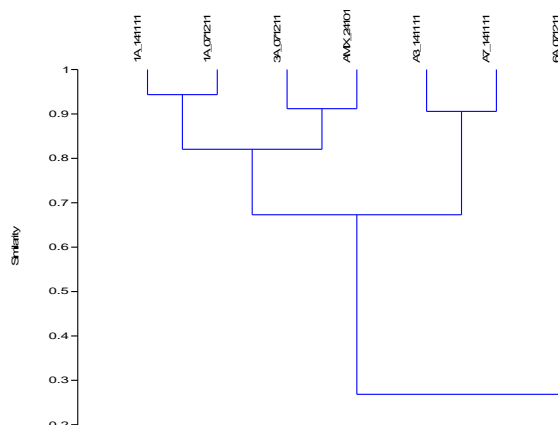


Figura AI.IV c. Dendograma calculado con distancia de Bray-Curis para las muestras los perfiles de T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa.

Tabla AI.IV b. Índices de similitud calculados para los perfiles de T-RFLPs de arqueas del reactor de vinasa

	0	1A_071211	3A_071211	6A_071211	1A_141111	A3_141111	A7_141111	AMIX_241011
Taxa_S		4	6	6	3	5	3	3
Individuals		55	76	88	47	47	48	49
Dominance_D	0.3309	0.2407	0.4003	0.426	0.3871	0.7092	0.3478	
Simpson_1-D	0.6691	0.7593	0.5997	0.574	0.6129	0.2908	0.6522	
Shannon_H	1.216	1.576	1.275	0.925	1.213	0.5608		1.078
Evenness_e^H/S	0.8433	0.8062	0.5962	0.8406	0.673	0.584	0.9791	
Brillouin	1.113	1.453	1.172	0.8462	1.077	0.4953	0.9946	
Menhinick	0.5394	0.6882	0.6396	0.4376	0.7293	0.433	0.4286	
Margalef	0.7486	1.155	1.117	0.5195	1.039	0.5166	0.5139	
Equitability_J	0.877	0.8798	0.7113	0.8419	0.7539	0.5105	0.9808	
Fisher_alpha	0.9917	1.528	1.457	0.7139	1.415	0.7093	0.7049	
Berger-Parker	0.4182	0.3816	0.6023	0.4681	0.5745	0.8333	0.4286	

AI.V Correlaciones reactor de vinasa

Las correlaciones se realizaron utilizando en software XLStat

Ho: NO existe corr.lineal

Ha: Si existe corr lineal

Se rechaza Ho si $p < 0,05$

Rechazo quiere decir que no puedo decir que no exista una corr. Lineal

Tabla AI.V a

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	AME	AMEreactor	MMB%	MSL%	MBT%	AGV ppmHAC in situ	AGV totales (ppm HAC)
AME	1	0,12	0,26	0,47	0,47	0,98	0,01
AMEreactor	-0,64	1	0,33	0,15	0,15	0,54	0,32
MMB%	0,45	-0,43	1	2,20E-03	2,10E-03	0,85	0,51
MSL%	0,3	-0,6	0,9	1	0	0,67	0,82
MBT%	-0,3	0,6	-0,9	-1	1	0,67	0,82
AGV ppmHAC in situ	0,01	-0,28	-0,09	0,2	-0,2	1	0,85
AGV totales (ppm HAC)	0,87	-0,44	0,27	0,09	-0,1	-0,09	1

Tabla AI.V b

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	AME G1	AGV totales (ppm HAC)	AGV ppmHAC in situ	MMB%	MSL%	MBT%
AME G1	1	1,10E-03	0,43	0,46	0,23	0,23
AGV totales (ppm HAC)	0,84	1	0,47	0,6	0,46	0,46
AGV ppmHAC in situ	0,28	0,26	1	0,7	0,43	0,43
MMB%	0,25	0,18	-0,14	1	0,01	0,01
MSL%	0,39	0,25	0,28	0,71	1	0
MBT%	-0,39	-0,25	-0,28	-0,72	-1	1

Tabla AI.V c

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	AMEG1	AGV ppmHAC in situ	MMB%	MSL%	MBT%	Acetico %	Propionico %	Isobutírico %	Butírico %	Isovalérico %	Valñérico %	Isocaproico %	Caproico %
AME	1	0,43	0,37	0,18	0,18	0,58	0,67	0,79	0,02	0,75	0,27	0,37	0,27
AGV ppmHAC in situ	0,28	1	0,7	0,43	0,43	0,02	0,02	0,03	0,34	0,35	0,9	0,26	0,73
MMB%	0,26	-0,14	1	3,90E-03	3,70E-03	0,8	0,85	0,55	0,34	0,78	0,65	0,64	0,81
MSL%	0,38	0,28	0,72	1	0	0,78	0,8	0,93	0,38	0,94	0,48	0,6	0,54
MBT%	-0,38	-0,28	-0,72	-1	1	0,78	0,8	0,93	0,38	0,94	0,48	0,6	0,54
Acetico %	-0,16	-0,67	-0,07	-0,08	0,08	1	4,20E-03	2,30E-03	0,02	0,01	0,56	0,03	0,73
Propionico %	0,13	0,67	0,06	0,07	-0,07	-0,69	1	0,3	0,36	0,83	0,88	0,36	0,59
Isobutírico %	-0,08	0,64	-0,18	-0,02	0,03	-0,72	0,29	1	0,62	4,90E-03	0,7	9,50E-05	0,36
Butírico %	0,61	0,32	0,27	0,25	-0,26	-0,61	0,25	0,14	1	0,41	0,22	0,71	0,8
Isovalérico %	-0,09	0,31	0,08	0,02	-0,02	-0,63	0,06	0,68	0,23	1	0,95	0,02	0,17
Valñérico %	-0,32	-0,04	-0,13	-0,21	0,21	-0,16	0,04	-0,11	0,34	-0,02	1	0,36	0,58
Isocaproico %	-0,26	0,37	-0,14	-0,15	0,15	-0,57	0,25	0,84	-0,1	0,61	-0,25	1	0,96
Caproico %	-0,32	-0,12	-0,07	-0,18	0,18	-0,1	-0,15	0,25	-0,07	0,38	0,16	0,01	1

Tabla AI.V d

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	AME	AMEreactor	MMB %	MSL%	MBT%	Acetico %	Propionico %	Isobiotirico %	Butirico %	Isovalérico %	Valñérico %	Isocaproico %	Caproico %	AGV ppmHAC in situ
AME	1	0,12	0,26	0,47	0,47	0,74	0,94	0,26	0,05	0,07	0,35	0,1	0,19	0,98
AMEreactor	0,64	1	0,33	0,15	0,15	0,95	0,56	0,7	0,58	0,4	0,2	0,78	0,01	0,54
MMB%	0,45	-0,43	1	2,20E-03	2,10E-03	0,53	0,74	0,18	0,42	0,4	0,59	0,04	0,86	0,85
MSL%	0,3	-0,6	0,9	1	0	0,88	0,74	0,52	0,55	0,52	0,62	0,29	0,52	0,67
MBT%	-0,3	0,6	-0,9	-1	1	0,88	0,74	0,52	0,55	0,52	0,62	0,29	0,52	0,67
Acetico %	0,14	-0,03	0,26	0,06	-0,06	1	5,00E-04	0,01	0,34	0,14	0,01	0,13	0,77	0,01
Propionico %	0,03	-0,27	-0,14	0,14	-0,14	-0,94	1	0,02	0,41	0,29	0,11	0,12	0,75	5,50E-04
Isobiotirico %	0,45	0,18	-0,53	-0,27	0,27	-0,82	0,8	1	0,79	0,17	0,06	0,01	0,59	0,06
Butirico %	0,7	-0,25	0,33	0,25	-0,25	-0,39	0,34	-0,11	1	0,51	0,61	0,27	0,65	0,41
Isovalérico %	0,68	0,38	-0,35	-0,27	0,27	-0,57	0,43	0,54	-0,27	1	0,05	0,11	0,26	0,48
Valñérico %	0,39	0,55	-0,23	-0,21	0,21	-0,82	0,61	0,69	0,22	0,7	1	0,32	0,08	0,19
Isocaproico %	0,62	0,13	-0,73	-0,43	0,43	-0,58	0,59	0,85	-0,44	0,61	0,41	1	1	0,18
Caproico %	0,52	0,86	-0,07	-0,27	0,27	-0,12	-0,13	0,23	-0,19	0,46	0,65	0	1	0,63
AGV ppmHAC in situ	0,01	-0,28	-0,09	0,2	-0,2	-0,88	0,96	0,74	0,37	0,33	0,56	0,57	-0,22	1

Tabla AI.V e

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

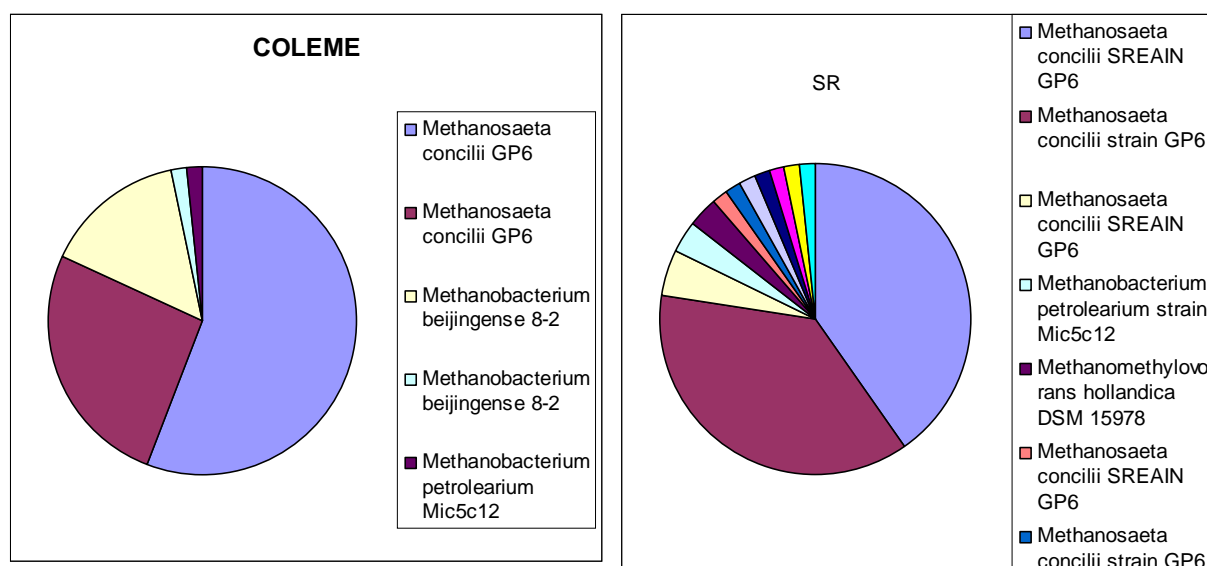
	AME	AMEreactor	MMB%	MSL%	MBT%	AGV ppmHAC in situ	AGV totales (ppm HAc)	DQOt_E	DQOs_E	DQOs_S
AME	1	0,09	0,37	0,6	0,59	0,79	0,02	0,24	0,26	4,30E-03
AMEreactor	-0,74	1	0,39	0,21	0,21	0,6	0,3	0,04	0,14	0,18
MMB%	0,4	-0,43	1	0,01	0,01	0,77	0,68	0,89	0,14	0,74
MSL%	0,25	-0,6	0,9	1	0	0,75	0,99	0,72	0,11	0,84
MBT%	-0,25	0,6	-0,9	-1	1	0,76	1	0,72	0,11	0,84
AGV ppmHAC in situ	-0,14	-0,27	-0,15	0,17	-0,16	1	0,58	0,24	0,89	0,46
AGV totales (ppm HAc)	0,83	-0,51	0,19	-3,40E-03	2,10E-03	-0,29	1	0,29	0,94	0,06
DQOt_E	0,57	-0,83	-0,07	0,19	-0,19	0,57	0,52	1	0,61	0,36
DQOs_E	-0,55	0,68	-0,67	-0,72	0,72	-0,07	0,04	-0,27	1	0,38
DQOs_S	-0,95	0,63	-0,18	-0,11	0,11	0,38	-0,8	-0,46	0,44	1

AI.VI Análisis bibliotecas de clones de rARN de16S de arqueas

Corrí el mothur (v1.35.1), filtré las secuencias (192) por calidad (123). Busqué con el Mega las que tenían polariza negativa y las di vuelta (reversa y complementaria) y saqué los primers.

Seguí con el mothur hice el clustering de OTUS (0,03), calculé los índices de diversidad y las curvas de rarefacción.

Identifiqué con el BLAST de NCBI cada una de las OTUs representativas y dps hice las abundancias relativas usando todas las secuencias (62 para SR y 61 para COLEME). Esto fue a mannoplaaaaaa porque la función “classify,seqs” de mothur no logró hacerla funcionar.



En las dos librerías la mayoría de las secuencias dieron identidades altas (97-100) con dos cepas de *Methanosaetas* secuenciadas a nivel de genoma (*Methanosaeta concilii strain GP6* NR_102903.1, NR_104707.1) Ambas cepas son acetoclásticas exclusivas hasta donde sé. En los dos reactores la cepa dominante de acetoclásticas fue distinta. Tengo que leer los trabajos de donde las reportan. En COLEME de todos modos, hubo mayor cantidad de secuencias de *Methanobacteriales* (los dominantes en los qPCR). En SR los *Methanobacteriales* son muy bajos, o sea que coinciden en los órdenes dominantes pero no en los porcentajes y de hecho el orden dominante se invierte. He aquí nuestro dilemma

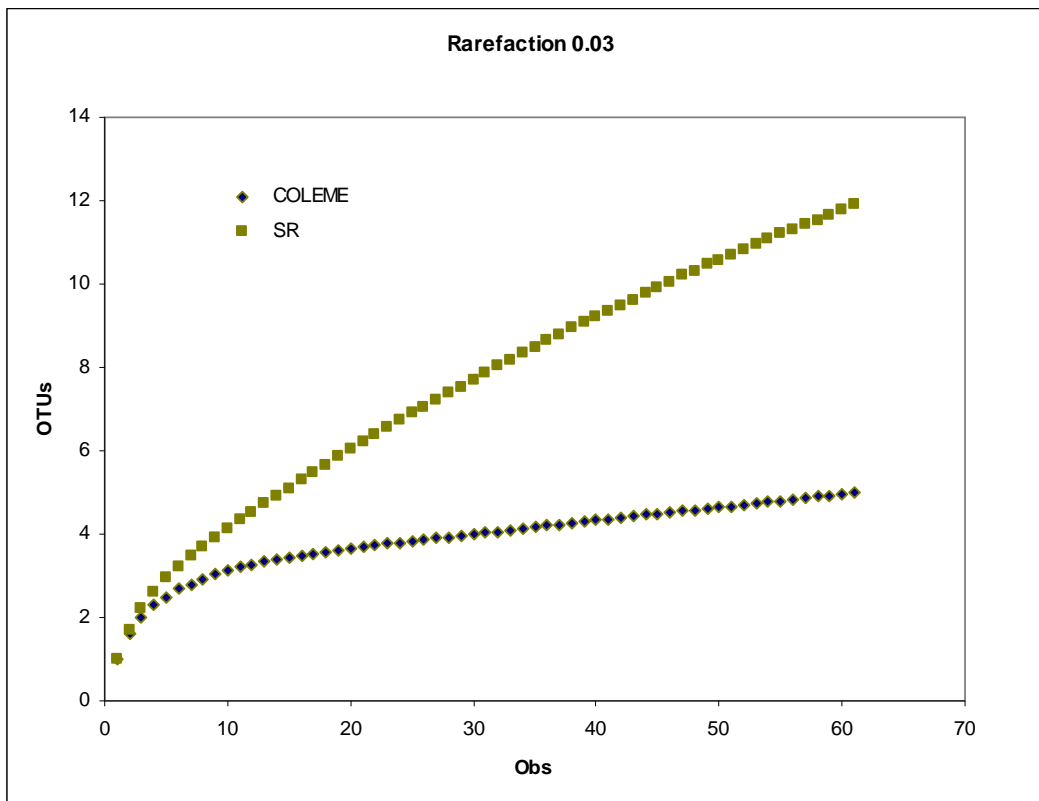
OTU 2.D	bp	Strain	%id	Acc. N°	e_value	Seqs	Abund%
OTU01	540	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_104707.1	0.0	34	56
OTU02	378	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_102903.1	0.0	16	26
OTU03	547	<i>Methanobacterium</i> <i>beijingense</i> 8-2	99	NR_028202.1	0.0	9	15
OTU04	525	<i>Methanobacterium</i> <i>beijingense</i> 8-2	98	NR_028202.1	0.0	1	2
OTU05	379	<i>Methanobacterium</i> <i>petrolearium</i> Mic5c12	96	NR_113044.1	1,00E-176	1	2

OTU	bp	Strain	%Id	Acc. N°	e_value	N° seq	Abund %
OTU01	723	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_104707.1	0.0	25	40
OTU02	604	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_102903.1	0.0	23	37
OTU03	612	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	98	NR_104707.1	0.0	3	5
OTU04	397	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12	95	NR_113044.1	8,00E-180	2	3
OTU05	555	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DSM 15978	98	NR_102454.1	0.0	2	3
OTU06	717	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	0.0	1	2
OTU07	620	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_102903.1	0.0	1	2
OTU08	720	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_102903.1	0.0	1	2
OTU09	582	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_102903.1	0.0	1	2
OTU10	523	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	0.0	1	2
OTU11	683	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	0.0	1	2
OTU12	511	<i>Thermocladium modestius</i> strain IC-125	83	NR_040779.1	1,00E-82	1	2

OTU	Reactor	Strain	%Identity	Acc. N°	Abund %
OTU01	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_104707.1	40
OTU02	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_102903.1	37
OTU03	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	98	NR_104707.1	5
OTU04	1.D	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12	95	NR_113044.1	3
OTU05	1.D	<i>Methanomethylovorans hollandica</i> DSM 15978	98	NR_102454.1	3
OTU06	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	2
OTU07	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_102903.1	2
OTU08	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_102903.1	2
OTU09	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	97	NR_102903.1	2
OTU10	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	2
OTU11	1.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	94	NR_104707.1	2
OTU12	1.D	<i>Thermocladium modestius</i> strain IC-125	83	NR_040779.1	2
OTU01	2.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_104707.1	56
OTU02	2.D	<i>Methanosaeta concilii</i> GP6	100	NR_102903.1	26
OTU03	2.D	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2	99	NR_028202.1	15
OTU04	2.D	<i>Methanobacterium beijingense</i> 8-2	98	NR_028202.1	2
OTU05	2.D	<i>Methanobacterium petrolearium</i> Mic5c12	96	NR_113044.1	2

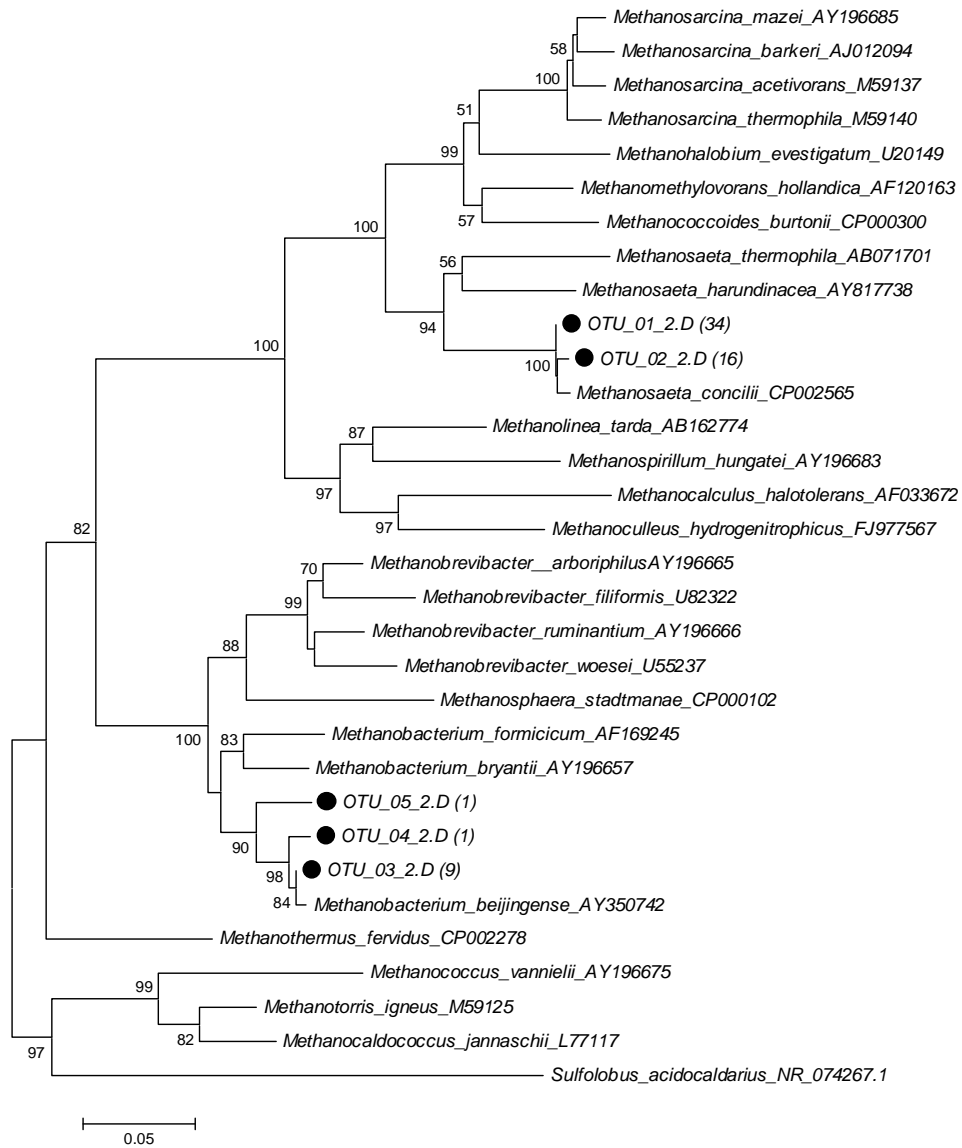
Cuando vemos las curvas de rarefacción parecen saturarse y SR parece ser más diverso que COLEME pero cuando vemos los % de cobertura (calculados como el N^o de OTUs con más de 1 secuencia/ N^o total de OTUs) da que en ambas librerías la C=30%.

	Indices			Cobertura
	Chao	Shannon	sobs	%
COLEME	6	1,3	5	96
SR	19	1,6	12	88

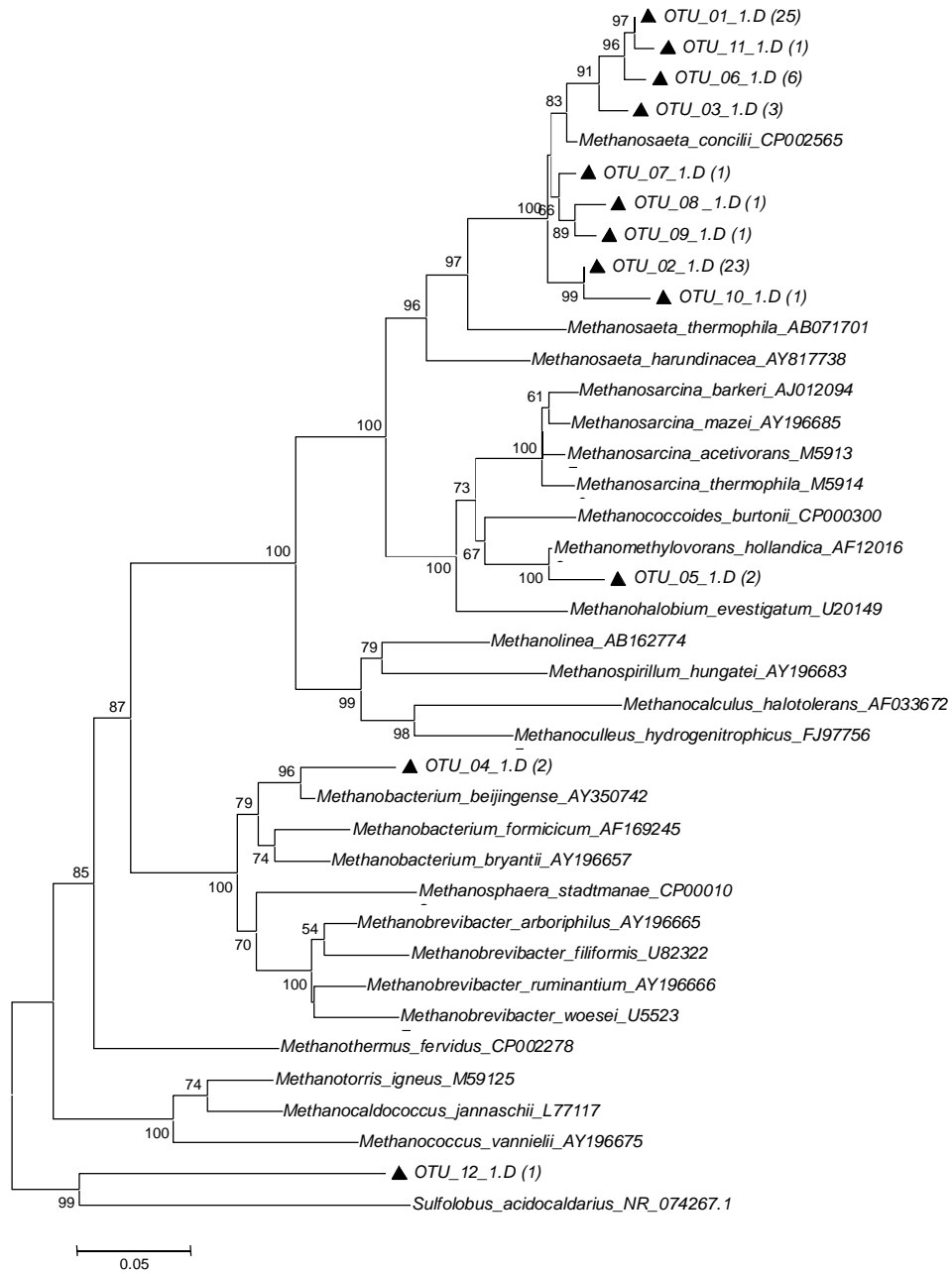


Filogenias:

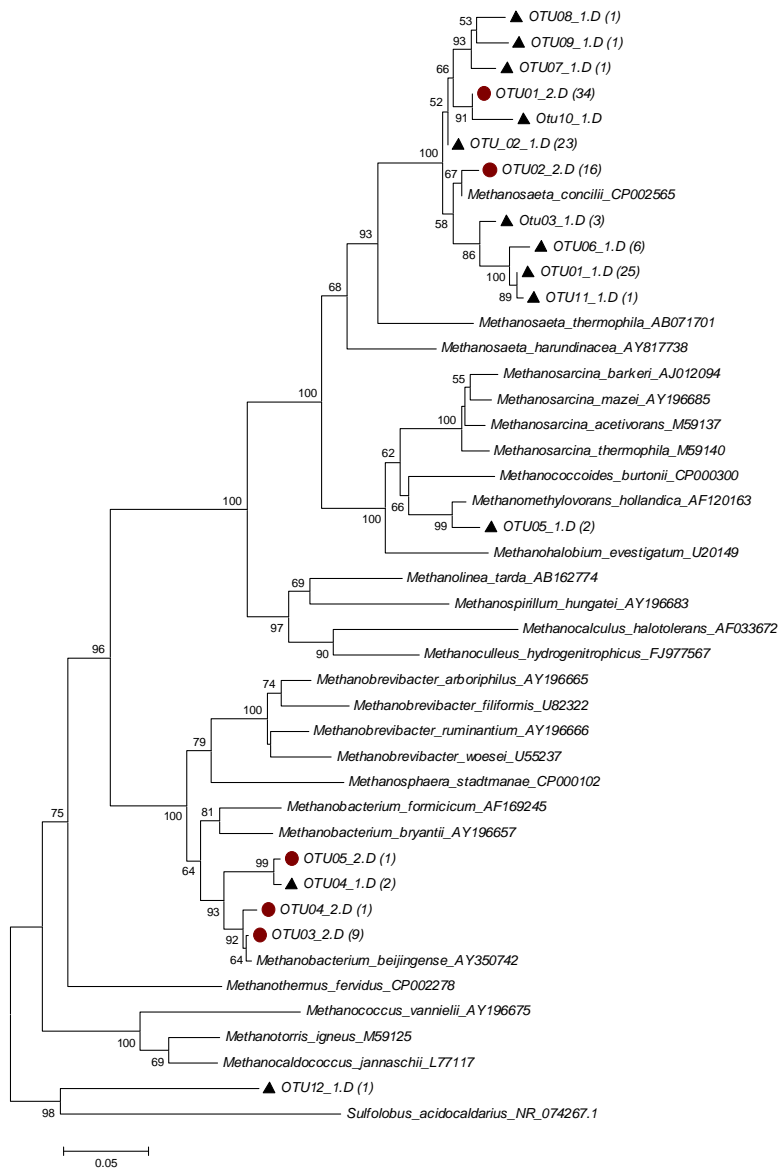
COLEME



San Ramón



COLEME Y San Ramón



Resumen:

Para construir las librerías hice un nested PCR, en el 1er PCR usé 21fa-1392 y en el 2do usé 21fa-958r.

Primers usados para construir las librerías:

ARCH A21fa 5'TTCCGGTTGATCCYGCCGGA3'

ARCH 958r 5'YCCGGCGTTGAMTCCAATT3'

ARCH 1392r 5'ACGGGCGGTGTGTACA3'

Arch109f 5'ACKGCTCAGTAACACGI3'(este lo busqué en el Mega y borré toda la secuencia corriente arriba)

Los resultados del qPCR no coincidieron con las librerías. Para conocer la cobertura de los primers usé la herramienta ProbeMatch de RDP. Los filtros usados fueron >1200pb y buena calidad (definida por los scores del Pintail de RDP) La base de datos fue consultada 20/4/2015:

-Con el par 21-1392 y permitiendo 1 mismatch, resultaron 383/3626 (10,5%) secuencias de arqueas. 217/2018 (10,7) secuencias del orden MSL y 59/1284 (4,6%) MMB.

-Con el par 21-985 y permitiendo 1 mismatch, 264/2018 MSL (13,1%), 25/1284MMB (1,9%) y 49/3473MBT (1,4%)

De estos resultados se desprende que los primers que elegimos para hacer las librerías tienen un sesgo hacia las arqueas del orden de los Methanosacinales y por eso presentaron una abundancia relativa superior en las librerías.

El par con el primer 1392r directamente no matcheó con ninguna secuencia del orden Methanobacteriales, mientras que el reverso 958r solo matcheó con un 1,4% de las secuencias depositadas de ese orden, en comparación con un 10% de los Methanosacinales. Este sesgo en los primers más el introducido por el nested explicaría los resultados de las librerías.

Pinto *et al.* (2012) estudiaron este problema en una comunidad microbiana artificial y rediseñaron primers específicos para arqueas flanqueando la región V3-V5, con una cobertura del 92% de las secuencias de *Euryarchaeotas* depositadas en el RDP.

Entonces:

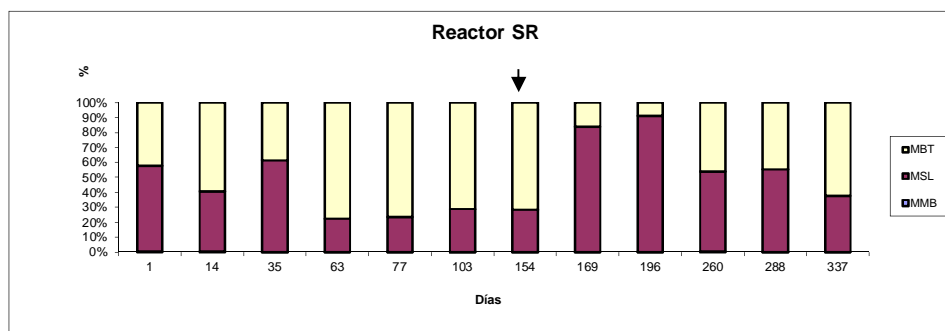
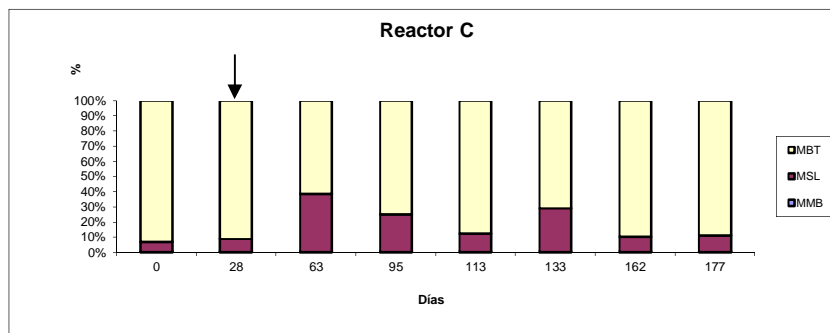
-No recomiendo el par de primers que usamos para describir la diversidad de arqueas en reactores anaerobios y sugiero comenzar a usar los reportados por Pinto *et al.*, de aquí en adelante tanto para las librerías como para otros análisis que involucren el gen 16S rRNA de arquea.

-Es más factible que los resultados de qPCR sean los que describen a la

comunidad de arqueas metanogénicas presentes en los reactores ya que se utilizaron 3 oligonucleótidos específicos para cada orden, en contraposición a los dos oligonucleótidos universales de arqueas que en consecuencia son menos específicos de cada orden.

-Los resultados de qPCR son concordantes con los ensayos de actividad hidrogenotrófica y acetoclástica realizados en muestras de uno de los reactores.

Las flechas indican las muestras que les hicimos las librerías



Cole, J. R., Q. Wang, J. A. Fish, B. Chai, D. M. McGarrell, Y. Sun, C. T. Brown, A. Porras-Alfaro, C. R. Kuske, and J. M. Tiedje. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis *Nucl. Acids Res.* 42(Database issue):D633-D642; doi: [10.1093/nar/gkt1244](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244) [PMID: 24288368]

Filogenia

En eIRDP voy a hierarchy browser y seleccioné las secuencias de Euryarchaeotasy filtré por Type strain, >1200pb, good quality. Ahí me quedé un archivo de 345 secuencias alieneadas. Lo bajé y lo edité en MEGA6, borré todas las secuencias que no fueran MethanoXXX, con 145 secs. Con ese multifasta usé tree builder en RDP para ver como quedaban e ir sacando secuencias hasta que quede algo visible

ANEXO II

TÉCNICAS

AII.I.DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE MEZCLAS GASEOSAS SIN HIDRÓGENO POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

1. Alcance

Esta técnica se ajustó para mezclas gaseosas que no contienen hidrógeno, y cuyos principales componentes son nitrógeno, metano y dióxido de carbono. Para muestras que contengan hidrógeno, referirse a la técnica “Determinación de la composición de mezclas gaseosas con hidrógeno mediante cromatografía gaseosa”.

2. Materiales y equipos

- Cromatógrafo de gases GC-2014 de Shimadzu
- Jeringa para gases de 1 mL de capacidad

3. Procedimiento

Encendido del equipo

- 4.1. Abrir el tanque de Argón (gas carrier) hasta una presión de 7 bar en el manómetro secundario. (Subir la presión en el cilindro lentamente, para evitar cambios bruscos de presión que puedan dañar al equipo o a la línea de argón).
- 4.2. Encender el equipo (el botón de encendido se encuentra en el costado inferior derecho) y dejar correr el gas durante 5 minutos.
- 4.3. Encender la PC y entrar en el usuario “Sala”
- 4.4. Abrir el programa “GCsolutions”, cuyo ícono de acceso directo está en el escritorio.
- 4.5. En la ventana emergente, seleccionar “1. Analysis”
- 4.6. En la interfaz del programa, a la izquierda del cromatograma, hay una ventana con varios archivos. Hacer doble clic en el archivo de métodos “Encendido”. (De no aparecer, abrir el explorador de datos y seleccionar la ubicación de dicho archivo: C:\GCsolutions\Análisis BioProA\Métodos). Presionar “DOWNLOAD”.
- 4.7. Hacer click en el botón “SYSTEM ON” que aparece en la ventana “Real Time”, a la izquierda de la pantalla.

- 4.8. El sistema entrará en el tiempo de espera (6 minutos). Una vez finalizado este tiempo, el equipo comenzará a calentar. En la zona derecha de la pantalla aparecen las condiciones de operación y las seteadas. Observar que las temperaturas comienzan a subir. Cuando se alcancen los valores seteados, el sistema dará aviso con la señal "SYSTEM READY".
- 4.9. Cargar el archivo de métodos "biogás SIN hidrógeno" y presionar "DOWNLOAD".. Verificar que las condiciones seteadas sean las siguientes:

Parámetro	Valor	Ventana
Temperatura del detector	110°C	DTCD1
Temperatura del precalentador	110°C	DTCD1
Corriente	0 mA	DTCD1
Temperatura del puerto de inyección	110°C	DINJ
Flujo de carrier (L)	21 mL/min	DINJ
Flujo de carrier (R)	21 mL/min	DINJ
Temperatura de la columna	110°C	DTCD1

- 4.10. Una vez alcanzadas todas las temperaturas seteadas, volver a la pestaña "DTCD1" y setear la corriente en 20 mA. Presionar "DOWNLOAD", darle ON al detector y esperar hasta que la línea de base del cromatograma se estabilice. (Al cambiar la corriente se puede producir un salto que puede salirse del rango de la pantalla. Si esto ocurre, alejar el zoom hasta que vuelva a verse la línea de base).
- 4.11. Repetir el paso anterior seteando la corriente primero a 40 y por último a 60 mA.
- 4.12. Si luego de que la corriente se fijó en 60 mA, la línea de base queda por debajo o por encima del cero, presionar "ZERO ADJUST". (Si el corrimiento del cero es muy grande, ajustar primero con la perilla "TCD ZERO" que está en el costado derecho del equipo, y luego con el "ZERO ADJUST" del programa).

Análisis

- 4.13. En la ventana "Real Time" (zona izquierda de la pantalla), hacer clic en "SINGLE RUN" y luego en "SAMPLE LOGIN".
- 4.14. Darle nombre a la muestra (ej. "vial_1_20_feb_2013") y guardar el archivo con el mismo nombre en la carpeta correspondiente al usuario (C:\GCsolutions\Análisis BioProA\Nombre_Usuario\vial_1_20_feb_2013.gcd). Presionar OK.
- 4.15. En la ventana "Real Time", presionar "START". El sistema se pondrá en espera de la inyección de la muestra.
- 4.16. Tomar 1 mL de muestra con la jeringa.
- 4.17. Despresurizar en acetona (sumergir la aguja en acetona, abrir la llave de la jeringa y observar la salida de burbujas. Llevar a 1 mL con la punta aún sumergida y cerrar la llave).
- 4.18. Cuando la pantalla diga "READY (STAND BY)", inyectar la muestra en el puerto de inyección DERECHO (el equipo dirá que el puerto izquierdo está pronto para la inyección. Ignorar este aviso.).

- 4.19. Inmediatamente después de inyectar la muestra, el sistema se pondrá en "NOT READY" por unos segundos. Cuando vuelva a "READY", presionar el botón "START" del equipo para iniciar la corrida. (Nota: el software identifica los picos según el tiempo de retención, por lo que es importante no dejar pasar tiempo entre que el sistema se pone en "READY" y el apretado del botón "START" del equipo)
- 4.20. Esperar a que se complete el análisis (aproximadamente 3 minutos) y presionar "STOP" en la zona izquierda de la pantalla.

Apagado

- 4.21. En el Real Time, cargar el archivo de métodos "Apagado" y presionar "DOWNLOAD".
- 4.22. Apagar el detector (botón OFF en la ventana de los parámetros de operación).
- 4.23. Esperar que la temperatura de la columna alcance los 30°C y la del detector sea menor a 100°C.
- 4.24. Apagar el sistema, primero desde el software presionando "SYSTEM OFF", y luego desde el propio equipo.
- 4.25. Cerrar el argón.

5. **Procesamiento de datos**

- 5.1. Abrir el programa "GCsolutions".
- 5.2. En la ventana emergente, seleccionar "Post Run"
- 5.3. En la interfaz del programa, abrir el archivo de datos guardado (en el ejemplo, vial_1_20_feb_2013.gcd).
- 5.4. Cargar el archivo de método: ir al menú "File" – "Load Method", y en la ubicación C:\GCsolutions\Análisis BioProA\Métodos, seleccionar el archivo "biogas SIN hidrógeno".
- 5.5. En la ventana "Results" seleccionar la pestaña "Compound". Se presenta una tabla con los componentes detectados y su porcentaje en la mezcla.

Nota: los porcentajes no están normalizados, por lo cual sumarán más del 100% (entre un 103 y un 105%). Para normalizarlos:

$$\%N_{2\text{normalizado}} = \frac{\%N_{2\text{medido}}}{\%N_{2\text{medido}} + \%CH_{4\text{medido}} + \%CO_{2\text{medido}}} * 100$$

$$\%CH_{4\text{normalizado}} = \frac{\%CH_{4\text{medido}}}{\%N_{2\text{medido}} + \%CH_{4\text{medido}} + \%CO_{2\text{medido}}} * 100$$

$$\%CO_{2\text{normalizado}} = \frac{\%CO_{2\text{medido}}}{\%N_{2\text{medido}} + \%CH_{4\text{medido}} + \%CO_{2\text{medido}}} * 100$$

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Martín Benzo	Martín Benzo	20-jul-2015

AII.II DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

1. Equipos

- GC 14B Shimadzu
- Columna Nukol 15mx0.53mm ID, 0.5 um film
- Detector de FID (hidrógeno + aire)
- Generador de hidrógeno
- Compresor de aire
- Centrifuga para matraces Ependorph

2. Materiales y reactivos

- Filtros de 0.45 um y de 0.22 um
- Jeringa de plástico
- Jeringa de 1 uL de vidrio para inyección en GC
- HCl 1+1
- Matraces Ependorph de 1 mL
- Gas nitrógeno

3. Preparación de la muestra

- 3.1. Si la muestra es sólida: pesar una cantidad determinada (m_M) y diluirla con agua destilada hasta un volumen determinado (V_D). Si se conoce un valor aproximado de la concentración de AGV de la muestra, elegir estos valores de forma que la concentración resultante al diluir quede dentro del rango de las curvas de calibración del GC.

- 3.2. Acidificar la muestra a pH menor a 2 con HCl 1+1 (verificar con tiras de pH y no con el pH metro)
- 3.3. Llenar un matraz Ependorph con la muestra acidificada.
- 3.4. Centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm.
- 3.5. Filtrar el sobrenadante, primero con filtro de 0.45 um y luego con filtros de 0.22 um y recolectarla en otro matraz Ependorph.

4. Encendido del GC y el software

- 4.1. Abrir el nitrógeno hasta una presión de 2 bar.
- 4.2. Verificar en el equipo que la presión "Primary" valga 50 kPa y la "Carrier" 40 kPa (están marcadas las posiciones en los manómetros)
- 4.3. Encender el GC y el detector FID.
- 4.4. Presionar la secuencia: DET+1+ENT, luego RANGE+0+ENT y POL+2+ENT.
- 4.5. Setear las temperaturas del detector y del puerto de inyección en 200 y 180°C respectivamente, presionando: DET+200+ENT, INJ+180+ENT. Llevar la temperatura de la columna inicialmente a 100°C, presionando COL+INIT TEMP+100+ENT. Presionar START.
- 4.6. Una vez que se haya llegado a las temperaturas fijadas, programar la rampa de temperatura que se usará luego de la inyección de cada muestra. Las condiciones son las siguientes:

Parámetro	Valor	Secuencia
Temperatura inicial de la columna	100°C	COL+INIT TEMP+100+ENT

Tiempo que se mantiene la temperatura inicial	3 minutos	COL+INIT TIME+3+ENT
Velocidad de calentamiento	25°C/mi- nuto	COL+PROG RATE+25+ENT
Temperatura final de la columna	190°C	COL+FINAL TEMP+190+ENT
Tiempo que se mantiene la temperatura final	4 minutos	COL+FINAL TIME+4+ENT

NOTA: Los ácidos de C1 a C7 terminan de salir aproximadamente a los 6 minutos. Los 4 minutos que se mantiene la temperatura a 190°C son para purgar impurezas y restos de AGV que hayan quedado retenidas en la columna.

- 4.7. Encender la PC y entrar en el usuario "IIQ"
- 4.8. Abrir el software "PeakSimple" (Acceso directo en el escritorio)
- 4.9. Seleccionar el canal 1 (correspondiente al GC para AGV)

5. Encendido del FID

- 5.1. Encender el generador de hidrógeno y enchufar el compresor (verificar que esté cerrada la válvula de purga).
- 5.2. Verificar que tanto la presión de hidrógeno en el GC, como la de aire estén en 50 kPa.
- 5.3. Presionar el botón IGNIT para bajar el flujo de aire, y sin soltarlo encender la llama del FID con el encendedor (se debe escuchar un "clic". Para verificar el encendido acercar un portaobjetos o un vidrio reloj al escape del FID. De estar encendido debe observarse la condensación de vapor).
- 5.4. Encender el detector

NOTA: Para poder encender el FID la temperatura del detector debe haber llegado a los 200°C.

6. Inyección de la muestra

- 6.1. Tomar un volumen de muestra de 1 uL.
- 6.2. Secar la aguja con papel higiénico.
- 6.3. Presionar START en el equipo para que inicie la rampa de temperaturas.
- 6.4. Inyectar la muestra.
- 6.5. Iniciar el cromatograma presionando "1" en el software.
- 6.6. Si alguna de las concentraciones de AGV se va del rango de las curvas de calibración: diluir con micropipeta y agua destilada, de forma de que la concentración resultante quede dentro del rango y volver a inyectar la muestra.

NOTA: previo a la inyección de la primera muestra, verificar la limpieza de la columna inyectando 1 uL de agua miliQ. De estar limpia la columna, solo debería aparecer el primer pico (correspondiente al solvente). Si aparecen otros picos, llevar la temperatura de la columna a 190°C y dejar correr el nitrógeno durante 5-10 minutos. Luego de este tiempo, volver a verificar la limpieza de la columna con agua miliQ.

7. Apagado del equipo

- 7.1. Llevar la temperatura de la columna a 190°C (COL+INIT TEMP+190+ENT+START).
- 7.2. Dejar correr el nitrógeno con la columna a 190°C por 15-20 minutos a fin de eliminar residuos de ácidos grasos que puedan haber quedado en la columna.
- 7.3. Fijar las siguientes condiciones previo al apagado

Temperatura de	Valor	Secuencia
Columna	25°C	COL+INIT TEMP+25+ENT
Detector	25°C	DET+25+ENT
Puerto de inyección	25°C	INJ+25+ENT

- 7.4. Una vez alcanzadas dichas temperaturas, apagar primero el detector y luego el equipo.

- 7.5. Cerrar la válvula principal del tanque de nitrógeno.
- 7.6. Despresurizar abriendo la llave de la derivación.
- 7.7. Cerrar la válvula secundaria.

8. Cálculos

- Para muestras líquidas:

$$\text{ppm AGV}_x = (\text{Área del pico } x) * F_x * N$$

Siendo:

F_x – factor de calibración del ácido graso volátil X (obtenido de la curva de calibración correspondiente).

N – factor de dilución realizada al medir (si la primera medida entra en el rango de la curva de calibración, $N=1$).

- Para muestras sólidas:

$$\text{ppm AGV}_x = (\text{Área del pico } x) * F_x * N * \frac{1000 * V_D}{m_M}$$

9. Bibliografía

- Analyzing Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography – Bulletin 855B – Supelco – 1998 Sigma-Aldrich Co.

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Martín Benzo	Martín Benzo	17-jul-2015

AII.III. DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS Y SÓLIDOS SUSPENDIDOS EN EFLUENTES LÍQUIDOS

1. Objetivo

- Determinación de sólidos totales, sólidos volátiles y sólidos fijos (ST, SV, SF).
- Determinación de sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles y sólidos suspendidos fijos (SST, SSV, SSF).

2. Fundamento

Los sólidos totales (ST) en un agua residual son los residuos resultantes de la evaporación y secado de una muestra en una estufa a $103 - 105^{\circ}\text{C}$. Incluyen los sólidos fijos (SF) que son los que permanecen luego de calcinar la muestra a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ y los sólidos volátiles (SV) que son los que se pierden en la calcinación y representan básicamente la materia orgánica presente en la muestra.

Los sólidos suspendidos totales (SST) son aquellos retenidos al filtrar o separados por centrifugación y también pueden dividirse en fijos (SSF) y volátiles (SSV).

3. Muestreo y preservación

Debe cuidarse especialmente que las muestras con sólidos sean representativas. Se almacenan en botellas de vidrio o plástico a 4°C . Analizar como máximo dentro de los 7 días de realizado el muestreo.

4. Materiales y equipos

- Cápsulas de porcelana ^(*)
- Balanza a la décima de miligramo
- Pipeta
- Estufa a $103 - 105^{\circ}\text{C}$
- Mufla

^(*) *Coordinar con el resto de usuarios del laboratorio el uso de las cápsulas*

5. Determinación de ST, SV, SF

Se recomienda realizar el ensayo por duplicado o triplicado.

- Secar en estufa a 103 -105 °C las cápsulas de porcelana y pesarlas (P_0). Es importante verificar que al momento de realizar esta operación, las cápsulas estén a temperatura ambiente, para lo cual, luego de retirarlas de la estufa, deben enfriarse en el desecador.
- Tomar con pipeta un volumen conocido (V) de una muestra bien homogeneizada y colocar en la cápsula. Alternativamente realizar la toma de una masa conocida (p).
- La muestra es evaporada en estufa a 103 - 105°C hasta peso constante (en general se deja una noche). Se deja enfriar hasta temperatura ambiente en desecador. Se vuelve a pesar la cápsula (P_1).
- La misma muestra (luego de secada en estufa y pesada como se describe anteriormente) se calcina en mufla, a 550°C hasta peso constante (en general durante 3hs).
- Se deja enfriar a temperatura ambiente en desecador.
- Se vuelve a pesar la cápsula (P_2).

6. Determinación de SST, SSV, SSF

- Tomar un volumen conocido (V) de una muestra bien homogeneizada. Centrifugar (en general, 10 a 15 minutos a 4000rpm). Descartar el sobrenadante y suspender el residuo en agua. Verter el contenido en una cápsula, arrastrando todo el residuo.

Alternativamente filtrar con papel de filtro en lugar de centrifugar.

- Para determinar SST, SSV y SSF, seguir los procedimientos indicados en los items ST, SV y SF descritos anteriormente. En todos los casos el volumen de referencia (V) será el volumen de la alícuota de muestra tomada.

7. Informe de resultados

Determinación de ST, SV, SF

Fecha	ID muestra	V (L)	P_0 (g)	P_1 (g)	P_2 (g)	ST(mg/L)	SV (mg/L)	SF(mg/L)

Determinación de SST, SSV, SSF

Fecha	ID muestra	V (L)	P_0 (g)	P_1 (g)	P_2 (g)	SST(mg/L)	SSV (mg/L)	SSF(mg/L)

8. Cálculos

Se calculan los sólidos totales como:

$$ST \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Peso seco}(g) * 1000}{\text{Volumen muestra (L)}} = \frac{(P_1 - P_0) * 1000}{V}$$

Se calculan los sólidos volátiles como:

$$SV \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(\text{Peso seco}(g) - \text{Peso calcinado}(g)) * 1000}{\text{Volumen muestra (L)}} = \frac{(P_1 - P_2) * 1000}{V}$$

Se calculan los sólidos fijos como:

$$SF \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Peso calcinado}(g) * 1000}{\text{Volumen muestra (L)}} = \frac{(P_2 - P_0) * 1000}{V}$$

9. Bibliografía

- APHA, AWWA, WEF (1995) Standard Methods for the examination of water and wastewater, 19th ed.

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Carla Scapinello Carina Roveta	Martín Benzo	23-jul-2015

AII.IV. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD METANOGENICA ACETOCLÁSTICA

1. Introducción

Para evaluar la viabilidad de la aplicación de sistemas de tratamiento anaeróbico para la depuración de un agua residual es preciso disponer de ciertos parámetros básicos del agua residual y del lodo biológico que va actuar en el sistema. Uno de los parámetros para evaluar el lodo es la actividad metanogénica del mismo.

La actividad metanogénica de un sistema anaerobio depende de la presencia de bacterias metanogénicas y de la transformación de los sustratos a metano por dichas bacterias. Los sustratos pueden encontrarse disponibles en cantidades adecuadas o bien, pueden derivar de otros compuestos, a través de bacterias no metanogénicas (fermentativas).

Las bacterias metanogénicas pueden clasificarse respecto a su capacidad para metabolizar sustratos para producir metano. De este modo, encontramos dos grupos funcionales o *gremios* que comparten características metabólicas pero que a su vez comprenden una gran variedad de grupos taxonómicos. El primer grupo metabólico lo comprenden los organismos acetoclásticos que utilizan acetato para producir metano y CO₂, estos organismos son considerados dominantes en la producción de metano contribuyendo con el 70% del metano producido a partir de acetato. El segundo gremio lo constituyen las bacterias hidrogenotróficas, que pueden utilizar H₂ y CO₂ como sustratos para la producción de metano. Estas bacterias también son las responsables de mantener bajas las presiones parciales de H₂ (<10Pa), necesarias para que las bacterias sintróficas puedan catalizar la conversión de ácidos orgánicos y alcoholes intermediarios en precursores del metano.

Con el ensayo de ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECÍFICA se determina la capacidad de la biomasa para convertir sustratos en CH₄ y CO₂. Se intenta repetir el proceso de degradación anaerobia, en un recipiente de ensayo trabajando en discontinuo, para evaluar la producción de metano en condiciones preestablecidas. La actividad metanogénica depende de las condiciones experimentales, por lo tanto se deben asegurar condiciones óptimas y constantes tales como la temperatura, concentración de sustrato y concentración de lodo.

Si asumimos una cinética de crecimiento de los microorganismos del tipo Monod se tiene que:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M X \frac{S}{K_S + S}$$

donde X es la concentración de microorganismos, S la concentración de sustrato, μ_M la velocidad máxima de crecimiento específica, y K_S la constante de semisaturación.

A su vez el consumo de sustrato está relacionado con el anterior por el coeficiente de rendimiento $Y_{X/S}$:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt}$$

La Actividad se define normalmente como la velocidad de consumo de sustrato específica, esto es referida a la cantidad de biomasa:

$$Ac = -\frac{1}{X_0} \frac{dS}{dt}$$

Si se asume que el coeficiente de rendimiento se mantiene constante

$$Y_{X/S} = -\frac{X_0 - X}{S_0 - S}$$

donde el subíndice “o” corresponde a condiciones iniciales, sustituyendo en las expresiones anteriores se llega a que:

$$Ac = \frac{Ac_M}{X_0} \cdot [X_0 + Y_{X/S} \cdot (S_0 - S)] \frac{S}{K_s + S}$$

donde $Ac_m = \mu_m / Y_{X/S}$ es la actividad específica máxima.

La concentración inicial de sustrato debe ser tal que cumpla la siguiente condición $S \gg K_s$. Dado que en el ensayo se utiliza ácido acético, cuya $K_s = 0.2$ g/L, la concentración inicial propuesta es de 2 g/L de DQO. El inconveniente de usar únicamente ácido acético como sustrato es que estamos evaluando la actividad las bacterias metanogénicas acetotróficas y no consideramos las hidrogenotróficas.

Para evaluar la actividad de todas las bacterias metanogénicas se sugiere usar una mezcla de ácidos grasos conteniendo ácidos acético, propiónico y butírico. En dicho caso las concentraciones iniciales propuestas son 2.0 , 0.5 y 0.5 g/L respectivamente, siendo sus $K_s = 0.2$, 0.05 y 0.05 g/L.

Si se cumple que $X_0 / Y_{X/S} \gg S_0 - S$ y que $S \gg K_s$ la cinética se aproxima a orden cero y entonces directamente la Actividad medida es Ac_m .

Cuando se grafica la producción acumulada de metano en función del tiempo, tal condición equivale a tener una línea recta, cuya pendiente, dividida por la cantidad de biomasa expresada como Sólidos Suspendidos Volátiles, nos da la Actividad Metanogénica Específica máxima

En esta técnica monitoreamos la cantidad de metano producido en viales sellados, en presencia de una mezcla de acetato como sustrato. La técnica combina el seguimiento del aumento de la presión dentro del gas dentro del vial (headspace) y el análisis de la composición del biogás producido por cromatografía gaseosa (GC-TCD).

2. Materiales y equipos

- Viales de volumen V (ver tabla 1), con sus correspondientes septos de goma y tapas de plástico.
- Llaves de 3 vías con aguas y septo de goma
- Transductor de presión
- Shaker en ambiente a temperatura controlada
- Cromatógrafo de gases
- Jeringas de 1 mL para muestras gaseosas

-Solución buffer:

- | | |
|------------------------------|-----------|
| • L-cisteína-HCl | 0,5g |
| • Resarzurina | 1.0mg |
| • NaHCO ₃ | 3.05g |
| • H ₂ O destilada | c.s.p. 1L |

3. Procedimiento

NOTA: los ensayos se realizarán por triplicado.

Previo a largada de viales

Dejar agotando el lodo a analizar por dos o tres días en cámara termostaticada a 30°C. En un vial grande tapado pero con la llave de tres vías abierta.

Este ensayo fue diseñado para una duración de 2 días, por lo que se recomienda largar los viales

alrededor de las 19hrs y luego medir cada 5hrs (9, 14, 19, 9,14, 19).

Preparación de los viales

- 3.1. Homogeneizar la muestra
- 3.2. Pesar en el vial una cantidad de lodo suficiente como para lograr una concentración en SSV adecuada (ver fórmula a continuación).

Se puede calcular la cantidad de lodo a agregar con la siguiente fórmula¹:

$$V_{LODO} = \frac{V_{CG} * \Delta P}{393.2 * AME_{AC} * \Delta t * [SSV]_{LODO}}$$

Donde:

- V_{LODO} – volumen de lodo a agregar (mL)
 - V_L- volumen de líquido (V_{ACETATO}+V_{AGUA}+ V_{LODO}) (ver Tabla 1)
 - V_{CG} – volumen de la cámara de gas (mL) V_{CG} =V_T-V_L
 - ΔP – variación de presión deseada (mmHg) , se recomienda 200mmHg
 - Δt – período entre medidas (d) , se recomienda medir cada 5hrs, es decir, 0.208d.
 - AME_{AC} – Actividad metanogénica acetotrófica estimada del lodo (gDQO/gSSV.d)
 - [SSV]_{LODO} – concentración de sólidos suspendidos volátiles del lodo (gSSV/L)
- 3.3. Agregar en el vial un volumen de solución de acetato de sodio de concentración 20 g/L (33.2 g/L de acetato de sodio trihidratado) de tal manera de obtener en el mismo una concentración de 2g/L de DQO (**aproximadamente 15 mL de acetato cada 100 mL de V_L**)
 - 3.4. Completar con solución buffer hasta el volumen de líquido deseado. Calcular el volumen de la cámara de gas resultante (ver tabla 1) e incorporarlo en la planilla de seguimiento.
 - 3.5. Registrar el pH. Verificar que se encuentra dentro del rango: 6.5-7.5
 - 3.6. Colocar un O-ring entre el frasco y la tapa
 - 3.7. Colocar la tapa de plástico con aguja y septo de goma en la llave de tres vías

¹ El factor 393.2 corresponde a (388 mL CH₄/gDQO)*(760 mmHg)/[(%CH₄)*(1000 mL/L)], asumiendo un porcentaje de metano en el biogás generado de 75%.

- 3.8. Verificar la hermeticidad del vial procediendo de la siguiente manera: Abrir la llave del cilindro de N₂ de manera que el manómetro indique 20 psi. Conectar la manguera desde el cilindro de N₂ a la vía lateral de la llave, presurizar el mismo y cerrar la llave de 3 vías. Medir la presión con el transductor de presión²: esta debe ser superior a 700 mmHg (de no ser así, volver a presurizar). Purgar el vial. Repetir este punto 3 veces. A la tercera carga, verificar hermeticidad sumergiendo el vial en agua y observando que no haya fugas de gas. Anotar el valor de presión luego de la última purga en la hoja de seguimiento como presión final, y registrar la hora de purga.
- 3.9. Colocar los viales en el shaker a temperatura constante.

Seguimiento

- 3.10. Durante la experiencia se realizan medidas de presión y composición de gas. Registrar la presión inicial y la hora de muestra **sólo si la medida de presión supera los 120 mmHg.**
- 3.11. Para extraer la muestra se utiliza una jeringa de 1 mL. La jeringa se introduce a través del septo de goma colocado en la llave de tres vías. Se abre la llave conectando el interior del vial con el septo y la aguja (ATENCIÓN: no abrir la llave para el lado incorrecto!!). Se toma la muestra y se cierra la llave de tres vías. Se descarta la muestra y se repite dos veces. Tener la precaución de abrir y cerrar la llave sólo cuando corresponda, para evitar pérdidas de gas. Luego de los descartes, extraer la muestra para análisis, lentamente para evitar el ingreso de aire. Cerrar la llave.
- 3.12. Despresurizar y llevar el volumen de la jeringa a 1 mL con la punta de la jeringa sumergida en acetona, para asegurar que se alcance la presión atmosférica y evitar ingreso de aire.
- 3.13. Inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases, previamente estabilizado, y arrancar el cromatograma. (Controlar que la presión del gas portador sea la misma que la de la curva de calibración).
- 3.14. Purgar el vial hasta 50 mmHg aproximadamente una vez que el análisis en el GC se completó correctamente. Registrar la presión exacta que quedó en el vial y la hora de purga.
- 3.15. Una vez finalizada la corrida, si se ve que la línea de base del cromatograma no comprende la totalidad de los picos, integrar manualmente de forma de medir el área total de cada pico.

² Para medir la presión se coloca el puntero del transductor de presión en la vía lateral de la llave de 3 vías, sosteniéndolo con firmeza. Si es necesario, colocar cinta de teflón para lograr un mejor ajuste. La lectura son mmHg de presión manométrica.

3.16. Leer las áreas resultantes y registrar en planilla.

3.17. Finalizado el ensayo, medir y registrar el pH

4. TABLAS

TABLA 1 – Volúmenes de los viales, Volumen de líquido y de cámara de gas recomendado y ΔP entre medidas.

Tipo de vial	Volumen Total (mL) - V_T	VL	VG	ΔP min entre medidas
Grande	308	200	108	200
Chico	136	80	56	200

Para los ensayos con lodo de reactores a escala industrial se recomienda el uso de los viales Grandes, para escala de laboratorio los viales chicos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Soto, M., Méndez, R., Lema, J.M. (1993). Methanogenic and non-methanogenic activity tests. Theoretical basis and experimental set up, *Wat.Res.*, vol.27, n°8, pp. 1361-137

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Magdalena López Martín Benzo Cecilia Callejas	Martín Benzo	20-jul-2015

AII.V. DETERMINACIÓN DE DQO POR MÉTODO DE REFLUJO CERRADO

Introducción

La DQO de una muestra es una medida del oxígeno equivalente necesario para oxidar la materia orgánica presente en dicha muestra que sea susceptible de oxidación. La oxidación de la mayoría de los compuestos orgánicos es del 95 al 100% del valor teórico. La piridina y compuestos similares son resistentes a la oxidación y los compuestos volátiles lo son de acuerdo al grado de contacto que tengan con el oxidante. El NH_4^+ presente en el efluente y el liberado de los compuestos orgánicos nitrogenados no se oxida en presencia de cantidades significativas del ion Cl^- libre.

Materiales y equipos

- Espectrofotómetro
- Bloque digestor
- Tubos de digestión. (ver verificación de tubos)

Verificación de tubos de digestión

Cada usuario del laboratorio debe tener su grupo de tubos identificados y verificados. La verificación consiste en chequear su absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm, con agua destilada y limpiando adecuadamente su exterior como se indica en la realización de las medidas. Se rota el tubo varias veces dentro de la celda y se leen los valores de absorbancia. Se seleccionan aquellos tubos cuyas medidas al girarlo no difieran en más de 0,005 y aquellos que entre sí difieran menos de 0,005.

Procedimiento

Preservación de la muestra: Si la muestra no se va a analizar dentro de las 48 hs de extraída se debe acidificar a pH menor o igual a 2 con H_2SO_4 . De esa forma se puede conservar 30 días.

- 4.1. Prender el digestor y esperar a que alcance la temperatura de digestión (150°C). Aprox. 40 minutos.
- 4.2. Diluir la muestra hasta un valor estimado de DQO dentro del rango para el cual se realizó la curva de calibración.
- 4.3. Llenar los tubos de digestión así (en el orden indicado):
 - 3,5mL de reactivo sulfúrico
 - 1,5mL de solución digestora
 - 2,5mL de muestra diluida

4.4. Preparar un blanco con:

- 3,5mL de reactivo sulfúrico
- 1,5mL de solución digestora
- 2,5mL de agua destilada

4.5. Preparar un tubo con solución estándar:

- 3,5mL de reactivo sulfúrico
- 1,5mL de solución digestora
- 2,5mL de solución estándar de 500 mgDQO/L (425mg KHP en 1000 mL)

4.6. Tapar los tubos, agitarlos y ponerlos en el bloque de digestión a 150 °C por 2hrs.

4.7. Retirar los tubos del bloque y dejar llegar a temperatura ambiente.

4.8. Agitar y esperar que decante el precipitado.

4.9. Medir la absorbancia en espectrofotómetro a 600 nm, habiendo calibrado el cero con el tubo que contiene el blanco. Cada tubo debe limpiarse previamente con papel humedecido en alcohol y secado con papel tissue. Girar el tubo durante la medida para descartar valores anómalos. Es posible detectar la necesidad de calibración tomando como referencia el tubo conteniendo solución estándar.

Preparación de soluciones

Solución digestora

Agregar a 500mL de H₂O destilada 10.26g de K₂Cr₂O₇ estándar primario secado a 103 °C por 2hrs, 167mL de H₂SO₄ y 33.3g de HgSO₄.

Disolver, enfriar a temperatura ambiente y diluir a 1000mL.

Reactivo sulfúrico

Agregar Ag₂SO₄ a H₂SO₄ conc. en el grado de 5.5g del primero por kg del segundo. Dejar uno o dos días para disolver.

Solución estándar y Curva de calibración

Solución madre: KHP (ftalato ácido de potasio) secado a 120 °C. Disolver 2551 mg del mismo en agua destilada y diluir a 500 mL. DQO teórico de la solución resultante: 1.176 mg de O₂/mg de KHP. Por lo tanto la solución es 6000 mg/L de O₂. Conservación en forma refrigerada de la solución estándar durante 3 meses, sin aparición visible de crecimiento biológico.

Curva de calibración: Preparar al menos 5 diluciones de la solución madre de KHP en el rango

250mg/L a 750 mg/L (se sugiere: 2/50, 5/100, 20/250, 5/50, 25/200). Preparar por duplicado las diluciones (*duplicado de dilución*) y a partir de cada una de ellas preparar dos muestras para digerir (*duplicados de digestión*). Preparar tres blancos con agua destilada.

Información de resultados

Fecha	Identificación de la muestra	Dilución	Abs	DQO(mg/L)
-------	------------------------------	----------	-----	------------------

Bibliografía

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19° Ed, 1995. Adaptación de la técnica realizada por el grupo BIOPROA.

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
	Evangelina Ripoll	30-abr-15

AII.VI. ANÁLISIS QIIME PARA ION TORRENT

Para comenzar se precisan 3 archivos el fasta con todas las secuencias, el qual con la calidad de las mismas y el map.

El ion torrent PGM da un archivo fastq y entonces hay que convertirlo a fasta y qual.

Por otro lado, construimos el archivo de mapeo (mapping). Nosotros lo hicimos sencillo e incluimos 5 columnas (#SampleID BarcodeSequence LinkerPrimerSequence Treatment Description)

i) lo primero fue chequear que el archivo de mapeo está bien hecho

```
$validate_mapping_file.py -m sr_mappingfile.txt -o sr_validate_mapping_file_output
```

ii) luego convierto fastq a fasta y qual

```
$convert_fastaqual_fastq.py -c fastq_to_fastaqual -f rawdataceci.fastq -o fastaqual
```

iii) lo siguiente es demultiplexar: esto es, separar las secuencias de acuerdo a su barcode. en este paso hacemos el filtrado de las secuencias y empleamos los siguientes criterios:

- b (longitud de los barcodes, en nuestro caso 10 bases)
- t (que indique la longitud de las secuencias luego del trimming)
- L 280 (longitud máxima en bases de las secuencias)
- l (longitud de las secuencias mínimo, por defecto es 200 y no se escribe. este parámetro es el que se puede cambiar para trabajar con secuencias más cortas o largas)

```
$split_libraries.py -m sr_mappingfile.txt -f rawdataceci.fna -q rawdataceci.qual -b 10 -t -L 280 -o sr_split_library_output
```

iv.a) busco las quimeras con uchime

```
identify_chimeric_seqs.py -i sr_split_library_output/seqs.fna -m usearch61 -o usearch61_checked_chimeras/ -r gg_13_5.fasta (no me funciona3 porque no nos da la memoria RAM del CPU de lab)
```

o alternativamente, bajo Usearch 7 (descargar firefox) y le doy los permisos

```
$chmod +x usearch7.0.1001_i86linux32
```

3 - Dereplication <<<USING USEARCH 7>>> (desde la carpeta dnd está; el multifasta)

```
$u usearch7 -derep_fulllength sr_split_library_output/seqs.fna -output sr_derep.fa -sizeout
```

4 - Abundance sort and discard singletons <<<USING USEARCH 7>>>

```
$u usearch7 -sortby size sr_derep.fa -output sr_sorted.fa -minsize 2
```

5 - OTU clustering using UPARSE method <<<USING USEARCH 7>>>

```
$u usearch7 -cluster_otus sr_sorted.fa -otus otus1.fa
```

6 - Chimera filtering using reference database <<<USING USEARCH 7>>> (Download Gold.fa dataset [HERE](#))

```
$u usearch7 -uchime_ref otus1.fa -db gold.fa -strand plus -nonchimeras otus2.fa
```

7 - Label OTU sequences OTU_1, OTU_2... <<<UPARSE Python script>>>

```
python /home/lem/Software/usearch_python_scripts/fasta_number.py otus2.fa OTU_ > otus.fa
```

8 - Map reads (including singletons) back to OTUs <<<USING USEARCH 7>>>

```
$u usearch7 -usearch_global sr_split_library_output/seqs.fna -db otus.fa -strand plus -id 0.97 -uc map.uc
```

9 - Create OTU table <<<UPARSE Python script>>>

```
python /home/lem/Software/usearch_python_scripts/uc2otutab_mod.py /home/lem//map.uc > otu_table.txt
```

10 - Convert OTU table in the .txt format to BIOM format (used by QIIME) <<<USING BIOM SCRIPT>>>

```
biom convert -i otu_table.txt -o otu_table_uparse.biom --table-type="otu table"
```

Si no hice todo el curado de las quimeras (iv.a) entonces paso de iii) a ivb):

iv.b) Uso pick otus de novo (serie de scripts)

```
$pick_de_novo_otus.py -i sr_split_library_output/seqs.fna -o otus
```

Para ver un resumen de clustering:

```
$biom summarize-table -i sr_otus_s_uchime61/otu_table.biom
```

Si hice el chequeo de quimeras (nota: lo hice en sr14)

v) realizo a la asignación taxonómica (acá retomo el QIIME)

```
$ assign_taxonomy.py -i otus.fa -o output (no lo puse, usÃ© el que tiene por defecto qiime: -r $PWD/rep_set/97_otus.fasta -t $PWD/taxonomy/97_otu_taxonomy.txt)
```

6) Agrego metadata (taxonomy) a la tabla OTU <<<USING BIOM SCRIPT>>>

```
$biom add-metadata -i otu_table_uparse.biom -o otu_table_tax.biom --observation-metadata-fp
output/otus_tax_assignments.txt --observation-header OTUID,taxonomy,confidence --sc-separated
taxonomy --float-fields confidence
```

7) Align sequences on QIIME, using greengenes reference sequences (use the file `otus.fa` from UPARSE as input file)

```
$align_seqs.py -i otus.fa -o rep_set_align (no lo uso, uso el que tiene por defecto qiime -t
$PWD/rep_set_aligned/97_otus.fasta)
```

8) Filter alignments on QIIME

```
filter_alignment.py -i rep_set_align/otus_aligned.fasta -o filtered_alignment
```

9) Make the reference tree on QIIME

```
make_phylogeny.py -i filtered_alignment/otus_aligned_pfiltered.fasta -o rep_set.tre
```

10) Check OTU Table on QIIME

```
biom summarize-table -i otu_table_tax.biom -o results_biom_table
```

11) Run diversity analyses on QIIME (or any other analysis of your choice). The parameter `-e` is the sequencing depth to use for even sub-sampling and maximum rarefaction depth. You should review the output of the `biom summarize-table` (step 18) command to decide on this value.

```
Score_diversity_analyses.py -i otu_table_tax.biom -m sr_mappingfile.txt -t rep_set.tre -e 18000 -o
core_output
```

y...il gioco é fatto! salú

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Cecilia Callejas Jorge Wenzel	Cecilia Callejas	15-marzo-15

AII.VII. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE BIBLIOTECAS 16S CON MOTHUR

-Filtré por calidad en mothur V32: trim.seqs(fasta=todas.fasta,minlength=200, maxambig=0, maxhomop=10, qfile=todas.qual.mlt, qwindowsize=50, qwindowaverage=25)

-Vi secuencias en MEGA, hice reversa y complementaria de las secuencias que me dieron polaridad negativa (Hebra-) haciendo BLAST en NCBI. Busqué los primers y los eliminé (109f y 985r) Guardo multifasta y alienamiento para seguir en mothur

-Vuelvo a mothur. Alineé las secuencias usando base de datos de greengenes y dps busqué quimeras con Uchime

-Alineamiento y clustering

mothur > align.seqs(candidate=SRlimpiasingap.fasta, template=gg_13_8_99.refalign) No le gustó

out: XXX.align

mothur > align.seqs(candidate=SRlimpiasingap.fasta, template=rRNA16S.gold.NAST_ALIGNED.fasta) Le gustó

out: XXX.align

mothur > chimera.uchime(fasta=SRlimpiasingap.align, reference=rRNA16S.gold.NAST_ALIGNED.fasta)

out:XXX

mothur > dist.seqs(fasta=SRlimpiasingap.align, calc=eachgap, output=lt)

outXXX.phylip.dist

mothur > cluster(phylip=SRlimpiasingap.phylip.dist)

out:XXX.phylip.an.dist

out:XXX.phylip.rabund

mothur > get.otulist(list=SRlimpiasingap.phylip.an.list, label=0.03)

out: XXXphylip.an.0.03.otu

-Secuencias de OTUs representativas

mothur > get.oturep(phylip=SRlimpiasingap.phylip.dist, fasta=SRlimpiasingap.fasta, list=SRlimpiasingap.phylip.an.list, label=0.03)

out:XXX.phylip.an.0.03.rep.names

out:XXX.phylip.an.0.03.rep.fasta

-Taxonomía (la hice con la lista de otus representativas. Por defecto método de Wang que es el que usa el RDP)

mothur > classify.seqs(fasta=SRlimpiasingap.phylip.an.0.03.rep.fasta, count=SRlimpiasingap.phylip.an.0.03.rep.count_table, reference=gg_13_8_99.refalign.fasta, taxonomy=gg_13_8_99.gg.tax, cutoff=80)

-Curvas rarefacción v1.15.0

```
mothur > read.dist(phylip=SRlimpiasingap.phylip.an.dist)
```

```
mothur > rarefaction.single(list=SRlimpiasingap.phylip.an.list, label=0.03, freq=1,
calc=sobs)
out:XXX.phylip.an.rarefaction
```

-Indíces

```
mothur > summary.single(list=SRlimpiasingap.phylip.an.list)
out:.phylip.an.summary
```

-Cobertura

C = % de la cantidad de diversidad muestreada con respecto a la muestra natural

Abrir el archivo: XXX.phylip.rabund

En la fila de 0.03 (nivel de especie), seleccionar aquellos OTUs que tengan más de 1 secuencia, sumarlas y dividir las entre el número total de secuencias.

Elaborado por	Revisada por	Fecha de revisión
Cecilia Callejas	Cecilia Callejas	marzo-2015