

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto del agregado de suplementos enzimáticos en la comunidad
microbiana de reactores metanogénicos de tratamiento de efluentes
de industria láctea”

Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

Patricia Bovio Winkler

Tutor: Dra. Claudia Etchebere

Realizada en la Cátedra de Microbiología Fac. de Química y el Laboratorio de Ecología

Microbiana del Instituto Clemente Estable

Setiembre 2013, Montevideo

1. INTRODUCCIÓN	6
EFLUENTES INDUSTRIALES	6
Importancia del tratamiento de aguas residuales.....	6
Normativa vigente	6
Aguas residuales en la industria láctea.....	8
BIOREACTORES DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	9
Tipos de reactores anaerobios	11
Reactor anaerobio de flujo ascendente UASB	12
MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO ANAEROBICO.....	13
Etapas del proceso de degradación anaerobia	15
Microbiología de la degradación anaerobia	17
Formación de gránulos metanogénicos	21
DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE LÍPIDOS	23
PROBLEMAS DE DEGRADACIÓN DE LAS GRASAS DE EFLUENTES DE INDUSTRIA LÁCTEA.....	25
Soluciones propuestas	27
Tratamientos para favorecer la degradación de lípidos.....	28
BASES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	30
Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	31
Nested PCR	33
Análisis multivariados (análisis de componentes principales y análisis en cluster).....	33
PARÁMETROS PARA DESCRIBIR COMUNIDADES MICROBIANAS	34
Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad	34
Riqueza.....	35
Dinámica	37
Organización de la comunidad.....	37
Antecedentes MRM y Reactores Anaerobios	39
ANTECEDENTES DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO ESTUDIADO	40
2. OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	44
Objetivo general	44
Objetivo específicos	44
Preguntas a responder.....	44
Estrategia experimental.....	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	46
Extracción de ADN	46
T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism)	46

Separación y detección de fragmentos	47
Análisis de los cromatogramas.....	48
4. RESULTADOS	49
DATOS DE OPERACIÓN DE LOS REACTORES	49
Datos de pH.....	50
Remoción de DQO	51
Producción de biogás	53
Remoción de grasas y aceites.....	55
EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS LODOS	57
ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE ARCHAEA POR T-RFLP DEL GEN DE ARNR DE 16S.....	59
Análisis de clúster y de componentes principales	60
Índices de diversidad.....	61
Determinación de los parámetros Ri, Dy y Co a partir de los perfiles de T-RFLP de Archaea	62
Riqueza de la comunidad	62
Dinámica de la comunidad.....	63
Organización de la comunidad.....	63
ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA POR T-RFLP DEL GEN DE ARNr DE 16S	64
Análisis de clúster y de componentes principales	68
Índices de diversidad.....	71
Determinación de los parámetros Ri, Dy, y Co para describir la estructura de la comunidad de bacteria a partir de los perfiles de T-RFLP.....	72
Riqueza de la comunidad	72
Dinámica de la comunidad.....	73
Organización de la comunidad.....	74
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
EFECTO DEL AGREGADO COMERCIAL SOBRE LA OPERACIÓN DE LOS REACTORES	76
EFECTO DEL AGREGADO DE PREPARADO COMERCIAL SOBRE LA COMUNIDAD DE BACTERIA	81
ESTUDIO DE LA COMUNIDAD DE ARCHAEA.....	86
6. CONCLUSIONES	90
7. PERSPECTIVAS	92
8. ANEXOS.....	93
9. BIBLIOGRAFÍA.....	101

RESUMEN

En este trabajo de tesis se estudiaron las comunidades microbianas de dos reactores anaerobios metanogénicos para el tratamiento de efluentes de una industria lechera localizada en Melo, Uruguay. Se estudió el agregado a uno de los reactores UASB (reactor A) de un preparado comercial hidrolítico diseñado para aumentar la remoción de grasas en sistemas de tratamiento de efluentes anaerobios. El otro reactor (reactor B) se operó sin ningún agregado como testigo para evaluar la eficiencia del suplemento.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto sobre la comunidad microbiana del agregado de preparado comercial. Para ello se realizó el monitoreo de la comunidad microbiana de los dos reactores durante un año (período I sin agregado, período II: con agregado de preparado hidrolítico al reactor A), mediante la técnica de T-RFLP del gen del ARNr 16S de Bacteria y Archaea.

Los resultados de análisis químicos mostraron un aumento en la remoción de grasas y aceites con el agregado del preparado al reactor A, no observándose variaciones significativas en la remoción de materia orgánica (medida como DQO) y producción de biogás.

El análisis de Clúster y de Componentes Principales realizado con los perfiles de T-RFLP de las comunidades bacterianas mostró un agrupamiento de las muestras del reactor A luego del agregado del suplemento comercial (período II), indicando cierto efecto sobre la comunidad. Para estudiar si la estructura de la comunidad microbiana se afecta con el agregado de preparado comercial, se utilizó los parámetros: Dinámica, Riqueza, y Organización de la Comunidad. Se encontró que en general la comunidad de Bacteria tuvo una mayor riqueza que la comunidad de Archaea, y la dinámica para Bacteria en general fue alta para los dos reactores. El agregado del preparado comercial

provocó un aumento en la dinámica y la desigualdad de la comunidad del reactor A pero no afectó significativamente la riqueza.

En conclusión, el agregado de preparado comercial ayudó a aumentar la degradación de grasas y afectó la comunidad microbiana volviéndola más dinámica y más desigual, sin embargo, este agregado no actuó en todo el proceso ya que no aumentó la producción de metano ni la remoción de materia orgánica.

1. INTRODUCCIÓN

EFLUENTES INDUSTRIALES

Importancia del tratamiento de aguas residuales

Hoy en día, la gestión de residuos se ha convertido en una prioridad en muchos países. Uno de los principales problemas es hacer frente a una creciente cantidad de residuos primarios de una manera ambientalmente aceptable [5]. La sociedad moderna genera grandes cantidades de residuos que representan una enorme amenaza para el medio ambiente, la salud humana y animal. Para prevenir y controlar esta amenaza, existen diferentes métodos de tratamiento y eliminación de residuos. La elección del método debe estar siempre basada en la máxima seguridad, el mínimo impacto ambiental y en la medida de lo posible, en la valorización de los residuos y reciclado de los productos finales [1].

Una de las principales tendencias de las políticas actuales de gestión de residuos es reducir la cantidad de residuos destinados a vertederos y reciclar la materia orgánica y los nutrientes de las plantas industriales de nuevo a la tierra. La digestión anaerobia es una manera de lograr este objetivo [1]. Se ha utilizado por años en el tratamiento de aguas residuales y representa un método atractivo para la reducción de lodos con la producción de energía a través de biogás [54]. El biogás generado, principalmente metano, puede ser utilizado como un potencial recurso energético renovable [1].

Normativa vigente

Actualmente el Uruguay posee un marco legal por el cual define las normas para prevenir la contaminación del medio ambiente. En el caso específico de la industria, cada vez se enfrenta a mayores requerimientos legales en cuanto la gestión ambiental, e incluso a nivel de mercado existe cierta competencia “ecológica” que ha llevado a que

las mismas deban adaptarse a tecnologías limpias que no generen impacto ambiental negativo.

Para el caso de vertidos líquidos industriales, el Uruguay cuenta con el Decreto 253/79 (reglamenta al Código de Aguas, Ley N° 14.859) el cual es específico para cursos de agua. En dicho decreto los cursos de agua del país son clasificados en cuatro clases según su uso actual o potencial. De acuerdo a esta clasificación (realizada por el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA), en acuerdo con OSE para los cursos de clase 1) se establecen los parámetros que deben cumplir con sus respectivos límites. Allí se establece que sólo se permitirá el vertido de efluentes en los cursos de agua si los mismos no perjudican la calidad de las aguas receptoras. Los parámetros controlados son entre otros: pH, oxígeno disuelto, DBO5 (demanda biológica de oxígeno), aceites y grasas, detergentes, amoníaco libre, nitratos, fósforo total, sólidos suspendidos, etc. Cuando algún cuerpo de agua no cumpla las condiciones establecidas para la clase en que fuera clasificado, el MVOTMA deberá establecer los programas de recuperación de dicho cuerpo de agua, tendientes a que se alcancen las condiciones adoptadas.

Los efluentes en sí mismos además tienen que cumplir con el artículo 11 del Decreto 253/79 donde la concentración de amoníaco en el efluente no debe exceder los 5 mgN/L si es desagüe directo al curso de agua, siendo ilimitado en caso de ser vertido a colector o por infiltración a terreno.

El MVOTMA es quien realiza las intimaciones correspondientes determinando las condiciones que deben cumplir los efluentes. Además ejerce el control general de la aplicación de estas normas pudiendo requerir de las Intendencias Municipales y de O.S.E. las acciones necesarias, en función de lo dispuesto por la normativa. A pesar de existir dicha reglamentación, cabe aclarar que aún quedan por resolver algunos aspectos

relacionados a la localización de las industrias y el efecto acumulativo de sus vertidos [70].

Un parámetro importante utilizado para monitorear el funcionamiento de reactores de tratamiento de efluentes y que mide la cantidad de compuestos orgánicos en el agua es la demanda química de oxígeno (DQO). Este parámetro es presentado en forma de porcentaje de materia orgánica removida en relación con la cantidad de materia orgánica introducida, la ecuación de de remoción de materia orgánica expresada en términos de DQO se expresa como:

$$\% \text{ Remoción DQO: } (DQO_{\text{entrada}} - DQO_{\text{salida}}) \times 100 / DQO_{\text{entrada}}$$

Este parámetro es el de mayor utilidad en la evaluación inmediata del sistema de tratamiento [61].

Aguas residuales en la industria láctea

Dentro del ramo lácteo en el Uruguay existen varios tipos de industrias, tales como plantas pasteurizadoras, queserías, etc. los cuales forman una parte importante de la producción nacional. Dicho ramo industrial es llevado a cabo en una parte importante del país, estando presente en todos los departamentos del territorio excepto en Tacuarembó, Rocha, Flores y Lavalleya (según los datos de SADI "solicitud de autorización de desagüe industrial" de la DINAMA) [70].

Sin embargo, la cuenca lechera de Montevideo (que comprende los departamentos de Canelones, San José, Florida y Montevideo) concentra más del 60% de la leche producida en la República. Las zonas vecinas de Flores, Durazno, Lavalleya, y Maldonado integran la misma cuenca y proveen aproximadamente un 8% del total [70].

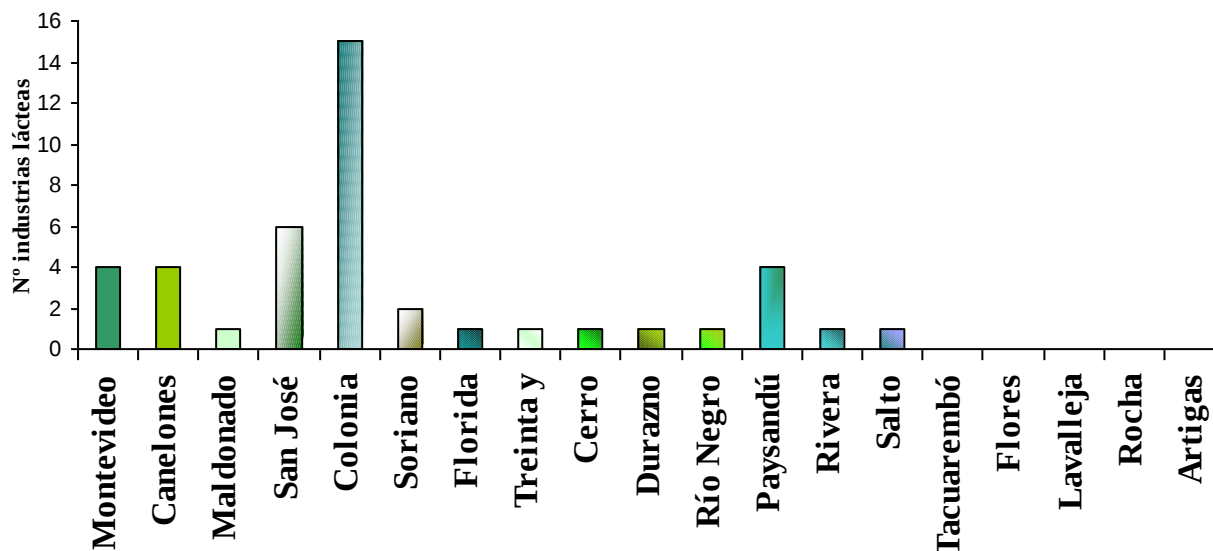


Figura 1. Comparación del número de industrias lácteas del Uruguay en los departamentos del país. Tomado del trabajo de **Travers 2008 [70]**.

Las características de los efluentes de las aguas residuales de productos lácteos pueden variar ampliamente de acuerdo con el tipo de planta industrial. Por lo tanto, cada situación individual debe ser considerada de forma separada para asegurar un diseño del tratamiento adecuado. Sin embargo, considerando el proceso de filtración de leche o productos basados en leche, un número de constituyentes son encontrados sistemáticamente en aguas residuales de la industria láctea: lactosa, lípidos, caseína y otras proteínas. Los lípidos, compuestos de triglicéridos, se encuentran principalmente en emulsiones resultado del proceso inicial de la etapa de homogeneización. Además los efluentes serán ácidos o básicos de acuerdo a la limpieza química usada en el proceso [46].

BIOREACTORES DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El principal objetivo para el uso de biorreactores es generar un ambiente óptimo para que la actividad biológica tenga lugar a gran escala, por lo tanto para el diseño de los biorreactores para el tratamiento de aguas residuales se deben conocer los parámetros

cinéticos asociados con las principales reacciones involucradas en el proceso como velocidad de eliminación de contaminantes por unidad de biomasa, velocidad de crecimiento de microorganismos, factor de conversión del sustrato consumido en biomasa y requerimientos nutricionales de los microorganismos.

Existen bioreactores aeróbicos y anaeróbicos, la principal diferencia entre estos es que los últimos deben excluir el oxígeno del sistema, debido a que el oxígeno interfiere con el metabolismo del sistema y además para que no salgan los olores producidos. Los reactores aeróbicos conteniendo masa suspendida requieren el uso de aireadores para proveer oxígeno a los microorganismos.

Los sistemas aeróbicos permiten el tratamiento de un amplio rango de aguas residuales con alto grado de estabilidad y alto grado de eliminación de carga orgánica (demanda biológica de oxígeno, DBO), nitrógeno y fósforo. Los sistemas anaerobios tienen la desventaja de que requieren tiempo de residencia mayor en el reactor y mayor tiempo de puesta en marcha; son más sensibles a la variación de las condiciones ambientales. La desventaja de los reactores aerobios es la elevada producción de biomasa, la cual puede verse reducida en su volumen y estabilizada mediante degradación anaeróbica [61].

Otra clasificación para biorreactores es continuos y discontinuos (batch), en los últimos el reactor se llena con el agua residual a tratar y se deja el tiempo necesario hasta completar el proceso. La ventaja reside en que se puede seguir la evolución del proceso en el tiempo, son simples y requieren mínimo equipamiento. Pero como los reactores en batch tratan volúmenes muy pequeños o utilizan un tiempo de residencia muy alto, se requiere un lugar para el almacenamiento del material a tratar. Generalmente el tratamiento biológico de aguas residuales a gran escala es operado a modo continuo, donde la planta de tratamiento se alimenta continuamente por el agua residual y a su vez una corriente es eliminada continuamente. Los sistemas continuos corren con la

desventaja de que si el sistema falla y no se puede corregir, la descarga del efluente no podrá cumplir con los requerimientos. Existe un modo intermedio de operación entre el batch y el proceso continuo llamado semi-batch, en el cual el agua residual alimenta continuamente a un reactor operado en batch. En tratamiento de aguas residuales este sistema se usa extensivamente utilizando reactor discontinuo secuencial (sequencing batch reactor, SBR) [61].

Los bioreactores también se pueden clasificar de acuerdo a si su biomasa se encuentra en forma suspendida o inmovilizada. Los aglomerados formados por microorganismos crecen hasta ser visibles y forman parte de la apariencia del lodo biológico, que puede encontrarse en forma de flóculos, de gránulos o adherido a un soporte (biofilm). En los reactores con biomasa suspendida los microorganismos responsables de la degradación se encuentran libremente suspendidos y como deben ser recuperados y reciclados para el buen funcionamiento del reactor, se puede utilizar un soporte sólido para que la biomasa no se lave con el efluente. La eficiencia del proceso depende de la capacidad del inóculo para formar los lodos. Por otro lado, en los reactores de biomasa fija o inmovilizada, los sólidos sobre los cuales los microorganismos se adhieren son soportes inertes donde las bacterias que constituyen la biomasa forman biofilms. La ventaja del crecimiento bacteriano adherido es que tienen la capacidad de operar con variedad de condiciones y con carga orgánica elevada sin riesgo de perder biomasa [55].

Tipos de reactores anaerobios

Los reactores biológicos anaerobios utilizados para el tratamiento de aguas residuales pueden ser divididos en dos grandes grupos en base a tipo de crecimiento microbiano:

1. de lecho fijo, formando biopelículas,
2. de crecimiento libre o suspendido.

Tabla 1. Tipos de reactores anaerobios clasificados según el estado en el cual se encuentra la biomasa.

Tomado del trabajo de Schmidell et al., 2007 [61].

Reactores con la biomasa no unida a soporte (Biomasa en suspensión)	Reactores con la biomasa unida a un soporte (Biomasa fija)
Reactor de mezcla completa (CSTR)	Filtros anaerobios (AF)
Reactor de contacto (ACP)	Biodiscos rotatorios (ARBC)
Reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho/manto de lodos (UASB)	Reactores de contacto con soporte (CASBER)
Reactor anaerobio por lotes en serie (SBR)	Reactores de lecho fluido y lecho expandido (FB/EB)
Reactor anaerobio con deflectores (ABR)	

Reactor anaerobio de flujo ascendente UASB

Un tipo especial de reactor anaeróbico es el reactor llamado “upflow anaerobic sludge bed” (UASB). Este reactor está formado por un tanque donde el agua residual a ser tratada entra por el fondo del reactor y lo recorre en un flujo ascendente hasta salir del mismo por su parte superior. Durante el curso del agua residual en el interior, la materia orgánica va siendo degradada y transformada en biogás. Dependiendo de la velocidad de ascenso del líquido en el interior del reactor y la producción de gas generado, proveen de agitación al sistema haciendo que se suspendan los sólidos sedimentados en el fondo [61].

El reactor UASB posee un dispositivo situado en la parte superior del reactor (separador de tres fases: sólido-líquido-gaseoso) llamado separador trifásico que permite separar la biomasa del efluente tratado y el biogás. Esto garantiza que la biomasa quede retenida en el reactor, haciendo que el tiempo de retención hidráulica sea independiente del tiempo de retención celular. Los gases son direccionados a una cámara presurizada y los sólidos a un ambiente menos turbulento pudiendo así sedimentar y retornar para el

medio en digestión. La operación de este reactor se verifica con la estratificación del lodo en el interior del mismo, haciéndose más denso en el fondo y a medida que aumenta la altura disminuye la densidad del lodo. La materia orgánica que entra por el fondo recorre el lecho de lodo donde inicia el proceso de hidrólisis y acidificación, finalizando en la producción de metano que aparece en la parte superior del lodo. Por lo tanto en condiciones normales se espera mayor acidificación en el fondo del reactor que en la parte superior del mismo. En la parte superior del reactor, la materia orgánica ya fue consumida en un 70%, saliendo del reactor sólo un 30% [61].

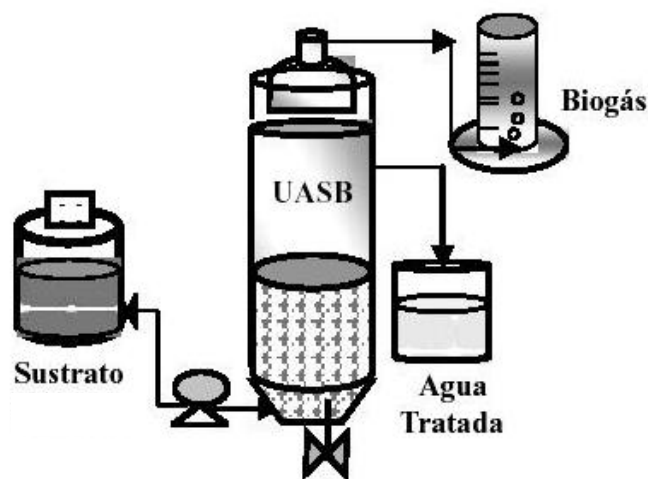


Figura 2. Esquema de un reactor anaerobio de flujo ascendente con lecho de lodo (UASB). Tomado del trabajo de Caldera et al., 2005 [10].

MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LOS SISTEMAS DE TRATAMIENTO ANAEROBICO

La digestión anaeróbica es el proceso por el cual la materia orgánica sufre una serie de reacciones oxidativas secuenciales en las que participan distintos grupos de bacterias y que culminan en la formación de CH_4 y CO_2 (**Figura 3**). Este proceso ocurre en ausencia de aceptores de electrones inorgánicos (O_2 , NO_3^- , NO_2^- , Fe^{+3} , Mn^{+4} , SO_4^{-2} , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, S^0 , SO_3^{-2} , etc.) y en ausencia de luz. Los electrones son finalmente transferidos

al CO₂, que es el aceptor terminal en esta compleja cadena trófica de microorganismos [61].

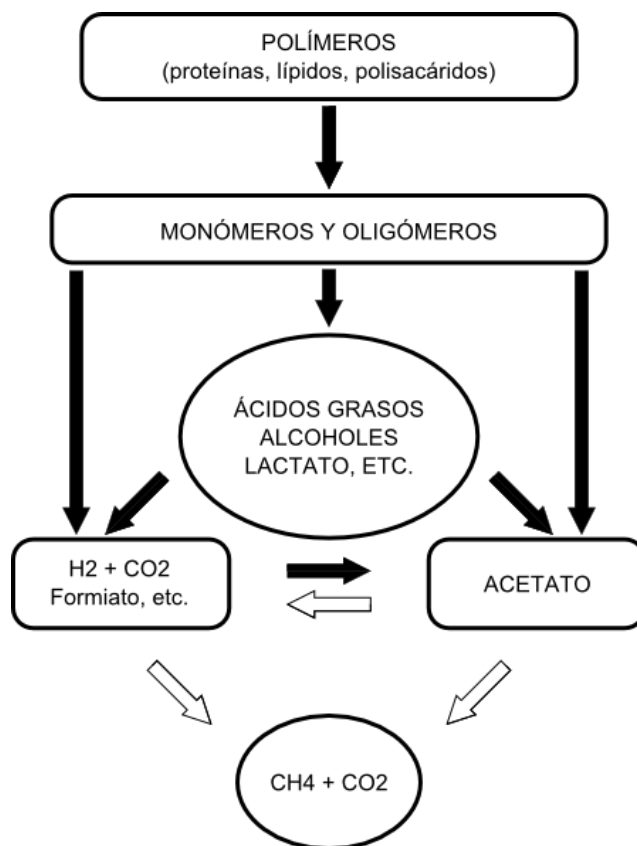


Figura 3. Flujo de carbono y electrones a través de los grupos tróficos de diversos microorganismos implicados en la degradación metanogénica de materia orgánica compleja. Adaptado del trabajo de Schink et al., 1997 [60].

Podemos distinguir en el proceso tres etapas básicas: I hidrólisis y fermentación, II acetogénesis y III metanogénesis, que permiten entender la necesidad de una estrecha cooperación entre los diferentes grupos fisiológicos de microorganismo para que el proceso se lleve a cabo. La dependencia entre los grupos es tal que las bacterias de la última etapa dependen exclusivamente de los productos generados en las etapas previas para subsistir, pero su actividad puede afectar sustancialmente a las bacterias de las otras etapas al consumir sus productos metabólicos. Estas etapas en general se realizan simultáneamente [60, 14].

El funcionamiento eficiente y estable de los biorreactores metanogénicos, se basa entonces en las interacciones entre los microorganismos que constituyen la comunidad microbiana que incluye bacterias fermentadoras, acidogénicas especializadas y acetogénicas sintróficas, y arqueas metanogénicas [4], con diversas vías paralelas para el metabolismo del sustrato [75].

La degradación microbiana anaeróbica de materia orgánica a CH_4 y CO_2 se produce naturalmente en una variedad de hábitats anaerobios, tales como los tractos intestinales de animales e insectos y sedimentos marinos [22].

Etapas del proceso de degradación anaerobia

I) Hidrólisis y fermentación

Durante la primera etapa se produce la hidrólisis de los polímeros complejos (polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos) a oligómeros y monómeros (azúcares, aminoácidos purinas, pirimidinas, ácidos grasos y glicerol). Los monómeros generados pueden ser fermentados por las bacterias fermentadoras primarias a ácidos grasos volátiles, lactato, alcoholes, succinato, etc. [61].

II) Acetogénesis y deshidratación

En esta etapa los alcoholes y los ácidos grasos, producto de la fase de hidrólisis y fermentación son degradados a acetato e H_2/CO_2 por bacterias fermentadoras acetogénicas. La degradación de estos compuestos es energéticamente desfavorable en condiciones estándar, pero si en el ecosistema existen bacterias consumidoras de H_2 , este puede mantenerse en bajas concentraciones y el cambio de energía libre se vuelve favorable. Las bacterias metanogénicas son las encargadas de consumir el H_2 generado permitiendo que se produzca la degradación de estos compuestos. La asociación entre las bacterias que degradan ácidos grasos y las bacterias metanogénicas consumidoras de

H₂ se llama asociación sintrófica y a la transferencia de equivalentes de reducción por medio del H₂ se llama transferencia de hidrogeno interespecies [60, 61, 69].

El sintrofismo puede definirse como un caso especial de cooperación simbiótica entre dos clases de bacterias metabólicamente diferentes que dependen una de otra para la degradación de cierto sustrato, en general por causas energéticas [54].

Si por distintas causas aumenta la concentración de hidrógeno del sistema, cesa el metabolismo de las bacterias acetogénicas y comienza a acumularse butirato y propionato. Por encima de cierta concentración se produce acidificación, que puede causar la inactividad total de la degradación anaeróbica por desbalance metabólico de la compleja cadena trófica. La medida de la concentración de ácidos grasos volátiles es uno de los parámetros que sirve para el seguimiento de los reactores anaerobios metanogénicos [61].

III) Metanogénesis

Este proceso lo llevan a cabo microorganismos metanogénicas que convierten acetato y H₂/CO₂ a CH₄ y CO₂. Los microorganismos metanogénicos pertenecen al dominio *Archaea*. Son anaerobias estrictas y crecen solamente a bajos potenciales redox, por debajo de -400mV. Son los únicos microorganismos capaces de producir metano y por lo tanto tienen enzimas y cofactores exclusivos. Consumen un número limitado de sustratos: H₂ y CO₂, formiato, acetato, metanol, etanol, isopropanol, metilaminas, piruvato y metilsulfuros [61].

La mayoría de los reactores metanogénicos empleados en el mundo operan a temperatura mesófilas (30-35°C), pero en condiciones moderadamente termófilas (55-65°C) incrementa la producción de metano de un 50-100% comparado con la operación

a 35°C [60, 61]. Estos sistemas se utilizan sobre todo para el tratamiento de aguas residuales que se producen a altas temperaturas.

Microbiología de la degradación anaerobia

Los reactores UASB son comúnmente utilizados en el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, especialmente en aquellas aguas residuales con alta carga orgánica. Su diseño permite la retención de una mayor cantidad de biomasa activa (en forma de gránulos) que otros reactores anaeróbicos. Estos gránulos anaerobios albergan varios grupos metabólicos de microorganismos implicados en la degradación anaerobia de compuestos orgánicos complejos, incluyendo bacterias hidrolíticas, fermentativas, acetogéncias y metanogénicas. Estos diferentes grupos tróficos interactúan entre sí dentro de los gránulos y convierten los compuestos orgánicos complejos de aguas residuales en metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) [53].

Los digestores anaeróbicos son ecosistemas con una alta diversidad de microorganismos. Estudios para el análisis del dominio *Bacteria* revelan que existen grupos dominantes en distintas proporciones en los digestores. La mayoría pertenecen a los siguientes grandes grupos: *Chloroflexi*, *Proteobacteria* (*Betaproteobacteria*), *Bacteroidetes* y *Firmicutes*; y un grupo minoritario de secuencias pertenecientes a *Chlorobi*, *Cianobacterias*, *Fusobacterias*, *Planctomycetes*, *Thermotogae* [14, 50, 57, 62].

Se ha reportado que organismos de los filos *Chloroflexi* y *Beta-Proteobacteria* se encuentran en la parte externa del gránulo, los primeros contribuyen a la degradación de compuestos orgánicos complejos; el H₂ se produce principalmente por organismos del filo *Firmicutes* en la capa intermedia, y arqueas del género *Methanosaeta* producen CH₄ en la capa interna del gránulo a partir de acetato solamente, mientras que las arqueas del género *Methanosarcina* son metabólicamente más diversas [69, 57, 21, 68].

En general, las comunidades bacterianas son muy dinámicas, mostrando cambios caóticos, incluso con un rendimiento estable del reactor. Hipotéticamente, esto se debe a la redundancia funcional entre diversos grupos filogenético que permiten oscilaciones de sus poblaciones sin efectos sobre la función del reactor. Las comunidades de arqueas son menos dinámicas que las comunidades bacterianas [83], relacionándose sus cambios filogenéticos con cambios en el rendimiento del reactor [18], esto se ha correlacionado con parámetros de proceso importantes, tales como ácidos grasos volátiles [27].

Bacterias Hidrolíticas- Fermentadoras

Estas bacterias son responsables de la degradación de la materia orgánica polimérica en ácidos grasos de cadena corta y otros compuestos orgánicos reducidos (por ejemplo, lactato, etanol), son bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas [69]. El proceso de hidrólisis se produce principalmente a través de la actividad de las enzimas hidrolíticas extracelulares secretadas por bacterias adheridas a un sustrato polimérico [64, 71]. Se han aislado un número de especies bacterianas que participan en la fase de hidrólisis de polímeros, incluyendo por ejemplo las especies que pertenecen a los géneros *Acetovibrio*, *Bacteroides*, *Clostridium*, y *Coprothermobacter* [19, 44, 79]. Como la fase de hidrólisis del polímero se produce extracelularmente, no contribuyen directamente a la captación de energía del metabolismo de la comunidad microbiana implicada. Así, las especies bacterianas que actúan en la fase de hidrólisis polimérica también son activas durante la fase de acidogénica con el fin de obtener la energía para el crecimiento celular y replicación. La fase de hidrólisis de polímeros de la degradación anaerobia se considera generalmente que es el paso de velocidad primaria limitante del proceso [19].

Durante la fase acidogénica, los compuestos monómeros u oligómeros producidos durante las fases de hidrólisis son metabolizados intracelularmente, en esta variedad

de vías metabólicas fermentativas, se han identificado como participantes en la fase de acidogénesis de la degradación anaerobia los filos *Actinomyces*, *Bacterioidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, y *Proteobacterias*.

Bacterias Acetogénicas y Sintróficos

Algunos acetógenos (homoacetogenos) utilizan el hidrógeno y los productos de fermentación como propionato y butirato para generar a través de su oxidación: acetato, CO_2 e H_2 [69].

Los géneros como *Syntrophobacter* y *Smithella* del orden *Delta-Proteobacteria* son capaces de convertir el propionato en acetato, mientras que los miembros del género *Syntrophomonas* del filo *Firmicutes* son capaces de convertir butirato y ácidos grasos de cadena más larga [65, 82].

Archaea metanogénicas

La fase terminal del proceso de la digestión anaerobia es la metanogénesis, y sus miembros pertenecen al dominio *Archaea*. Durante esta fase del proceso el acetato, formiato, y/o $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ se convierten en metano (CH_4) [69, 3, 7].

Los metanógenos se dividen filogenéticamente en tres grupos de acuerdo a la similitud filogenética y fenotípica [3, 7]. El primer grupo de metanógenos (**Figura 4**), incluyen los órdenes *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, y *Methanopyrales* mientras que los grupos I y II, sólo incluye los órdenes *Methanomicrobiales* y *Methanosarcinales* respectivamente [3, 14]. Esta distinción es importante, ya que los metanógenos Clase I y II son ambos considerados como hidrogenotróficos, sólo utilizan formiato, y / o $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ como sus sustratos para metanogénesis. La tercer clase, por otro lado, se caracteriza por ser acetotrófica, es capaz de usar acetato y, dependiendo del género particular, también puede utilizar metanol, metilaminas u otros compuestos de un carbono [3].

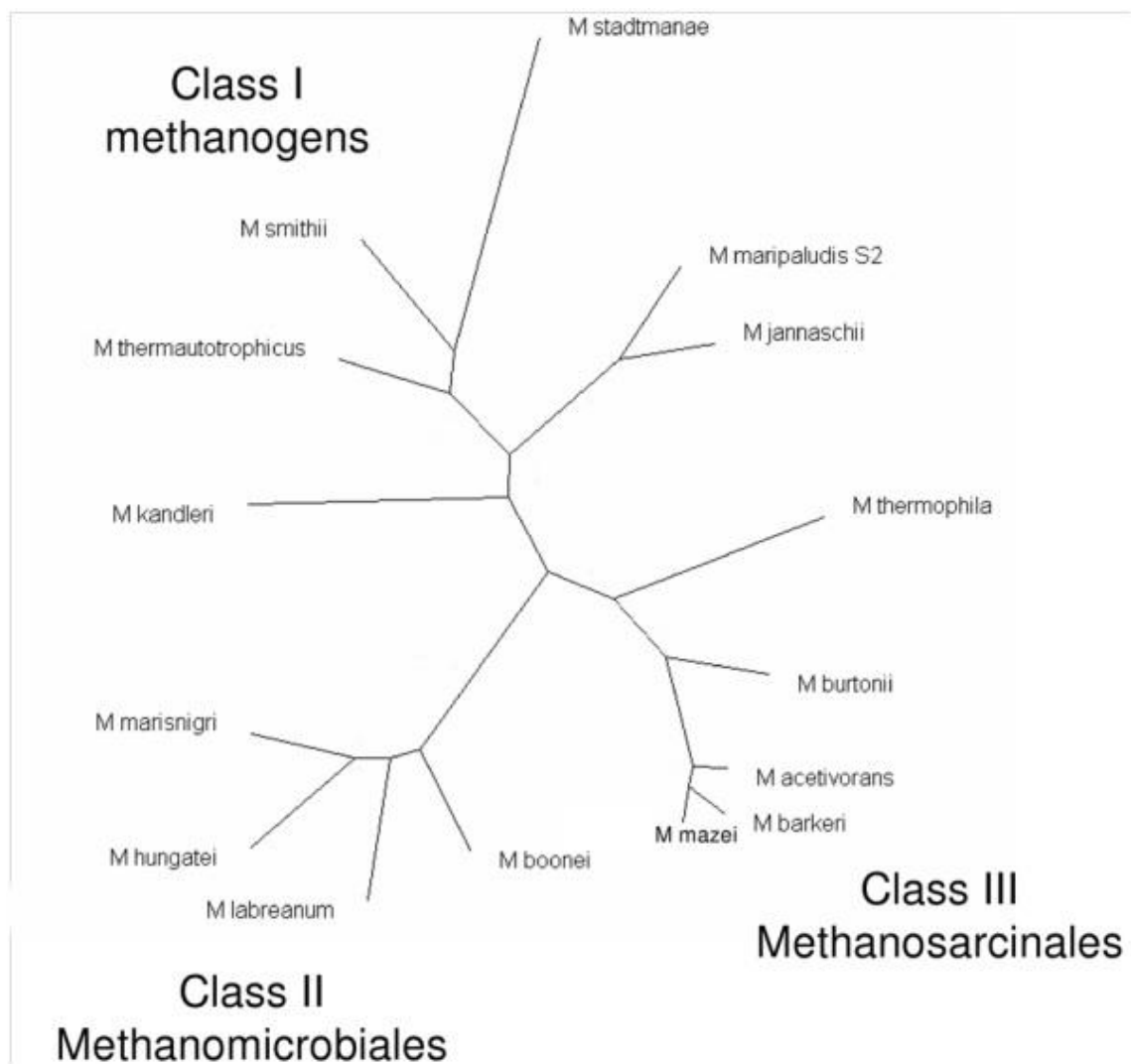


Figura 4. Árbol filogenético de arqueas metanogénicas basado en siete enzimas esenciales de la metanogénesis y cofactores de biosíntesis [2].

Durante el proceso de digestión anaerobia, la clase I de metanógenos juegan un papel crucial en el consumo de hidrógeno libre en el reactor. Esto es crítico dado que la conversión sintrófica de ácidos grasos de cadena corta, como por ejemplo propionato a acetato, es termodinámicamente desfavorable bajo presiones parciales bajas de hidrógeno [60].

Los estudios que examinan la distribución de acetógenos sintróficos han encontrado que en general existe una estrecha proximidad física con metanógenos hidrogenotróficos, esto permite realizar transferencia de hidrógeno [6]. Los metanógenos hidrogenotróficos

incluyen los géneros *Methanobacterium*, *Methanoculleus*, y *Methanospirillum* [31]. Mientras metanógenos hidrogenotróficos son importantes en el mantenimiento de bajas presiones parciales de hidrógeno en el reactor, se estima que la mayoría del carbono es convertido en CH₄ a partir de acetato [33]. Los metanógenos de la clase III son metanógenos acetotróficos, utilizan principalmente acetato para la producción de CH₄. Las dos familias principales de la clase III son *Methanosarcina* y *Methanosepta*. Mientras que los miembros de la *Methanosarcina* son capaces de utilizar otros compuestos metilados más allá de acetato, todas las especies conocidas de *Methanosaeta* utilizan acetato como sustrato único [43].

Formación de gránulos metanogénicos

La granulación de lodos es un fenómeno típico en reactores UASB, en el que los microorganismos forman densos agregados como resultado de su propiedad de auto-inmovilización. En estos reactores, el gránulo es una unidad funcional que comprende todos los diferentes grupos tróficos de microorganismos necesarios para la degradación anaeróbica de compuestos orgánicos [52].

No se conoce con exactitud el proceso de formación del gránulo metanogénico pero se ha analizado su compleja estructura mediante microscopia principalmente, y se ha verificado que constan de varias capas: la más externa está formada principalmente por bacterias fermentadoras primarias e hidrolíticas y las internas (más anaerobias) están constituidas por bacterias acetogénicas y metanogénicas. El centro del granulo está formado por minerales y restos celulares, que actuarían como soporte para la formación del granulo. Algunas de las bacterias metanogénicas son filamentosas (*Methanosaeta* antes conocida *Methanothrix*), lo que ayuda a la formación de un esqueleto; las bacterias que forman polímeros extracelulares juegan un rol preponderante en la cohesión del granulo [61, 62].

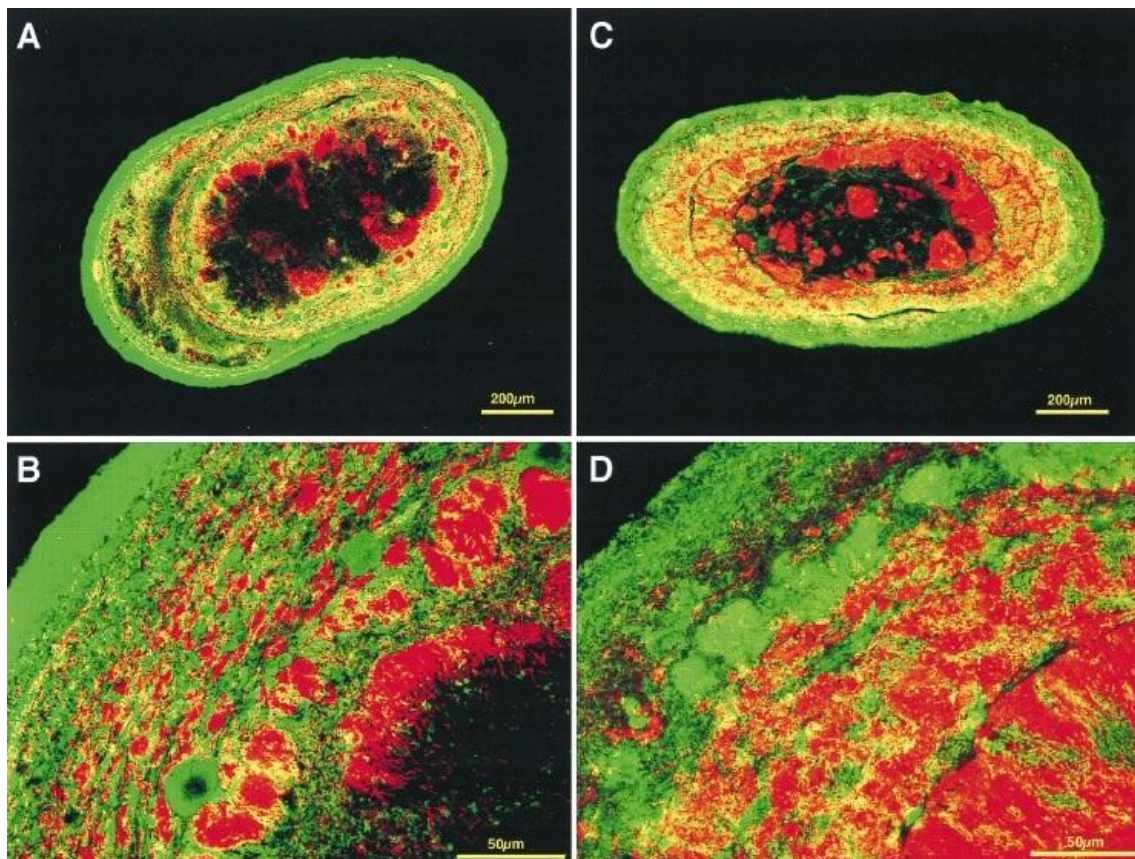


Figura 5. Microfotografías que muestran imágenes de cortes de gránulos metanogénicos mesófilos y termófilos obtenidas mediante hibridación in situ fluorescente y microscopía confocal. Las secciones de los gránulos se hibridaron simultáneamente con las sondas dirigidas al dominio Bacteria (EUB338, marcada con Cy3, verde) y al dominio Archaea (ARC915, marcada con Cy5, rojo). Los gránulos mesófilos (A y B) y termófilos (C y D), se muestran a bajo aumento (A y C) y a mayor aumento (B y D). Tomado del trabajo de **Sekiguchi et al., 1999 [63]**.

La estructuración de los microorganismo en distintas capas favorece la transferencia de hidrogeno interespecies porque los microorganismos están inmovilizados y la distancia intercelular se reduce, favoreciendo la etapa II que es energéticamente desfavorable. Además protege a las bacterias individuales de efectos ambientales adversos como la variación de pH, ingresos de sustancias tóxicas y aumentos abruptos de la concentración de sustratos por aumento de carga [61].

El flujo ascendente y el tiempo de retención hidráulico bajo provoca el desarrollo de biomasa granular, que es clave en el mantenimiento de la comunidad microbiana en el digestor. La biomasa granular se asienta hacia abajo, contra el flujo hidráulico, para formar un manto de lodo, donde se produce la mayoría de metabolismo activo microbiano. Si bien los aspectos de la granulación de la biomasa están siendo todavía

investigados, por lo general es aceptado que los microorganismos filamentosos tales como *Methanosaeta* juegan un papel importante en la unión física y la agregación de los microorganismos durante la formación del gránulo. Debido a la estrecha proximidad de los microorganismos en los gránulos anaerobios, se ha demostrado que la tasa de conversión de carbono en CH_4 es mayor en la biomasa granular que en la no granular, esto se debe a una mayor transferencia de metabolitos entre organismos. La biomasa granular se ha investigado intensivamente debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas [52].

DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE LÍPIDOS

La concentración de proteínas y lípidos en reactores anaeróbicos de tratamiento es en general alta. La cantidad de lípidos en general es mucho menor que la de proteínas o polisacáridos, pero en algunos casos, como el del lodo del desagüe o industrias lácteas, es un componente mayoritario. Aunque las proteínas y lípidos son sustratos cuantitativamente importantes para la degradación anaerobia, no ha sido estudiado tan exhaustivamente como la fermentación de carbohidratos [80].

Los lípidos se hidrolizan y liberan ácidos grasos. La galactosa (en el caso de galactolípidos) y glicerol son fermentados a productos sin generar NH_4^+ o S^{2-} . Las últimas reacciones se llevan a cabo por otros grupos metabólicos de bacterias como las bacterias reductoras de sulfato o los sintróficos productores de H_2 , que están asociados con bacterias fermentadoras en muchos ambientes anaeróbicos [81].

Hidrólisis de ésteres de glicerol

En ambientes anaeróbicos, los ésteres de glicerol primero se hidrolizan con la liberación de ácidos grasos. El glicerol, galactosa, colina y otros componentes liberados por la hidrólisis son fermentados principalmente a ácidos grasos volátiles por las bacterias

fermentadoras. Éstas no degradan ácidos grasos aunque algunas especies pueden hidrogenar ácidos grasos insaturados. En algunos ambientes como lodos de digestores o sedimentos acuáticos donde el tiempo de retención del material en el sistema es largo, tanto los ácidos grasos de cadena larga como corta son β -oxidados a acetato por la bacterias productora de H_2 [81].

En la digestión anaeróbica, los LCFAs (long chain fatty acids) son degradados principalmente por β -oxidación a acetato e hidrógeno y finalmente pasan a metano o dióxido de carbono por la metanogénesis [28], esto se sucede en una serie de procesos microbiológicos que convierten los compuestos orgánicos a metano en la ausencia de oxígeno. Un esquema de estos procesos se muestra en la **Figura 6**:

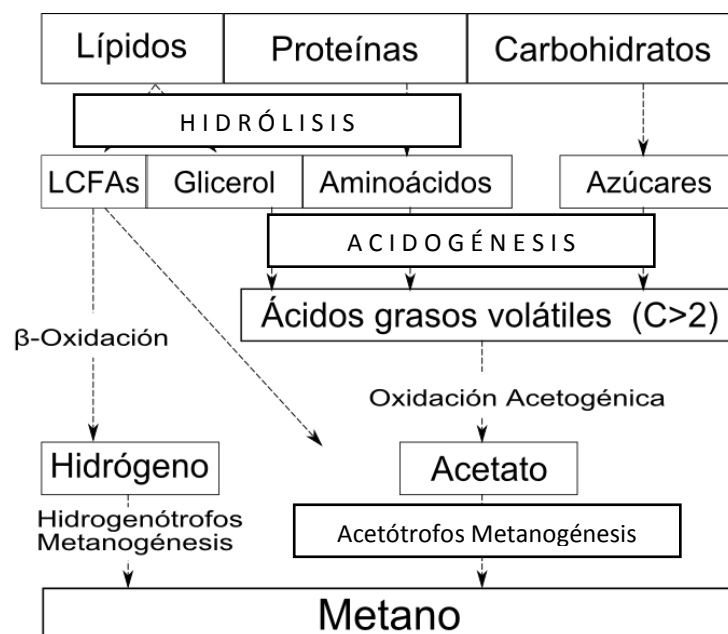


Figura 6. Ruta metabólica para la digestión anaerobia de compuestos orgánicos mostrando la degradación de lípidos. Adaptado de Kuang et al. 2002 [30].

Normalmente todos los LCFA requieren acetogénesis antes de la metanogénesis, la β -oxidación es la principal vía observada en la digestión anaeróbica de LCFAs:

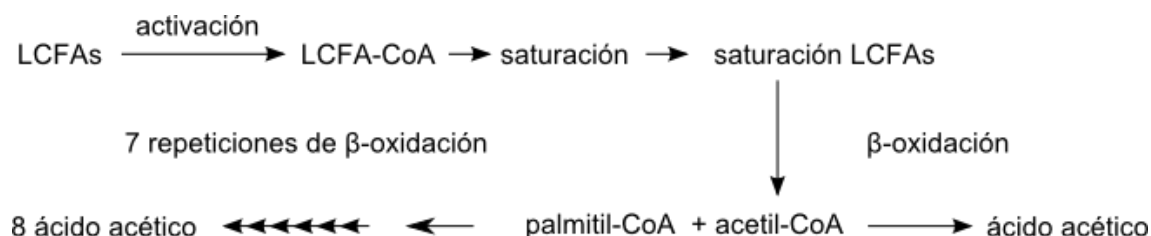


Figura 7. Proceso de β-oxidación a partir de LCFAs hasta ácido acético. Adaptado de **Kuang et al. 2002** [30].

Durante la β-oxidación, los LCFAs insaturados y saturados se activan por la enzima acil-CoA sintetasa presente en la membrana citoplasmática de las células, estos LCFAs activados entran en las células y son liberados en ésta antes de que comience la degradación a través de la β-oxidación. A continuación las cadenas largas saturadas de acil-CoA se someten a β-oxidación. Las moléculas de cadena larga no saturadas de acil-CoA requieren saturación antes de entrar en el proceso de β-oxidación. Durante el ciclo de β-oxidación, la cadena larga de acil-CoA se rompe en una de dos carbonos formando acetil-CoA, que puede ser liberado como ácido acético sin activación adicional. El resto de cadena larga acortada de acil-CoA como sustrato permanece en el ciclo de β-oxidación hasta que todos los átomos de carbono se descomponen a acetil-CoA, y finalmente a ácido acético y/o malónico. Por lo tanto la enzima Acil-CoA sintetasa, es importante en la degradación oxidativa, tanto en la transferencia de LCFA y como en β-oxidación [30].

PROBLEMAS DE DEGRADACIÓN DE LAS GRASAS DE EFLUENTES DE INDUSTRIA LÁCTEA

El uso de reactores anaerobios en el tratamiento de aguas residuales en la industria láctea ha sido limitado debido a que la tasa de hidrólisis de materia orgánica (grasas) es baja, formándose dentro un manto por arrastre o adsorción. El resultado es la dilución de la biomasa, la afectación de las propiedades de transferencia de masa y

el deterioro de la capacidad de la sedimentación de los lodos. Como consecuencia de esto la actividad de los lodos se reduce [58, 59, 55, 26].

Se reportó que el grado de biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales de la industria láctea ricas en grasas está limitado por la hidrólisis de las grasas (luego de un ensayo en batch con biomasa no adaptada) [52]. Sin embargo, utilizando cargas moderadas y sustratos adaptados a los microorganismos, la hidrólisis de grasas puede no ser la etapa limitante de la velocidad en el proceso total de tratamiento. Al no estar limitados por la hidrólisis, el ritmo del proceso total, puede estar limitado por una transferencia de masa reducida debido a la adsorción de ácidos grasos de cadena larga (LCFA) en el lodo [48 , 49] o por el efecto inhibitorio de LCFA en poblaciones acetotróficas metanogénicas [51, 25]. De acuerdo a una investigación reportada [26], la flotación de lodo en reactores UASB debido a adsorción de LCFA puede ocurrir a concentraciones de LCFA menores a aquellas que producen el efecto inhibitorio [46].

Se demostró que los efectos inhibitorios de palmitato (en representación de la LCFA) dependerán no sólo de la concentración de palmitato sino de su relación a la biomasa. La retención de lodos en el reactor se ve favorecida, y esto permite el uso de cargas de alimentación más elevadas, de esta forma el digestor de lodos alcanza una alta eficiencia [46].

Otro problema en la degradación de las grasas en reactores anaerobios es la acidificación producida por aumento de la concentración de ion hidrógeno del sistema además del ácido acético, generando el cese del metabolismo de las bacterias acetogénicas y, debido a esto, acumulación de ciertos metabolitos. Es necesario entonces una continua eliminación de estos compuestos del medio a través de la metanogénesis [5]. La medida de la concentración de ácidos grasos volátiles es uno de los parámetros que sirve para el seguimiento de los reactores anaerobios metanogénicos

ya que permite detectar problemas de acumulación de metabolitos y acidificación de los reactores [61].

Soluciones propuestas

La alimentación de los reactores a través de pulsos genera un aumento de la tolerancia de bacterias metanógenas acetotróficas a los LCFA, y se obtienen resultados satisfactorios para la operación continua tras una etapa de aclimatación de la biomasa por medio de estos pulsos de alimentación [13].

El uso de lodos floculantes en lugar de granulares tiene una mayor eficiencia en la eliminación de LCFA y el tratamiento de efluentes complejos. Por el contrario, los lodos floculantes parecen ser menos resistentes a inhibición de LCFA. Por lo tanto, se sugiere el uso de lodos granulares como inóculo apropiado para el tratamiento de los reactores de aguas residuales ricos en lípidos (grasas, aceites) para disminuir los efectos tóxicos de los productos de hidrólisis de lípidos o triglicéridos [25].

Como resultado de las dificultades en el tratamiento de efluentes complejos en reactores de manto de lodo, usualmente se usan métodos de pre-tratamiento, como la separación de grasas mediante flotación por aire disuelto [46].

Grandes cantidades de residuos ricos en lípidos (LCFAs) son generados en la industria láctea, estos son buenos sustratos para la digestión anaerobia debido a que el rendimiento de metano obtenido es superior en comparación con el de proteínas o carbohidratos [24]. Sin embargo, la degradación anaerobia de lípidos es uno de los temas menos investigados.

Hay mucha discusión en la bibliografía en cuanto al paso que limita la conversión del sustrato a biogás cuando se degradan sustratos complejos tales como lípidos. Algunos estudios han demostrado que la hidrólisis de los lípidos a glicerol y LCFAs puede ser

rápida, y que el problema principal durante la digestión de lípidos es la degradación de los LCFAs [35, 47]. Sin embargo, el área de la interfase de sustrato disponible para la hidrólisis puede ser un factor limitante [56]. El tipo de lípido también tiene una influencia sobre qué paso en el proceso de degradación será limitante [36].

Tratamientos para favorecer la degradación de lípidos

Diferentes métodos de pre-tratamiento se han investigado para mejorar el proceso de digestión, tales como:

- (1) pre-tratamiento químico de los residuos por NaOH, Ca(OH)_2 o HCl,
- (2) adición de enzimas,
- (3) pre-tratamiento biológico mediante la utilización de microorganismos hidrolíticos,

Estos tratamientos pueden cubrir una variedad de residuos, tales como lodos activados, aguas residuales ricas en lípidos, residuos sólidos de hogares y agua residual de matadero [38, 35]. Pero, cada método tiene importantes inconvenientes. No se recomienda el pre-tratamiento químico alcalino ya que resulta en un aumento en el pH en el proceso de digestión [35].

El pre-tratamiento por adición de la enzima fue demostrado tener efectos positivos (aumento de la concentración libre LCFAs), sin embargo, el proceso puede ser costoso y por lo tanto no es factible económicamente. La posibilidad del pre-tratamiento con enzimas producidas por microorganismos aerobios se ha demostrado con hongos lipolíticos [11] y con una mezcla de cultivos bacterianos que comprenden productores de lipasa, proteasa y amilasa [40]. Sin embargo, utilizando microorganismos aeróbicos para el tratamiento previo, puede ser necesario el suministro de oxígeno, aumentando el costo del proceso. Mientras que la adición de microorganismos anaeróbicos ha sido investigada como medio para mejorar las actividades xilanolíticas, celulolíticas y

hemicelulolíticas, esto no ha sido muy investigado usando cepas que exhiben actividad lipolítica [4, 39].

En este sentido, en el trabajo de Cirne y colaboradores [15], se estudió el efecto de bioaumento utilizando una cepa anaerobia lipolítica como forma de mejorar la hidrólisis y solubilización de los lípidos en el proceso de digestión anaerobia de residuos de un restaurante con aguas residuales ricas en lípidos. Se utilizó una bacteria lipolítica anaerobia estricta aislada de rumen bovino. Estos autores encontraron que cuando el proceso de bio-aumento fue positivo, pueden producirse dos efectos: un incremento en la producción de metano y/o incremento en el ritmo de producción de metano. Si se observa un aumento la producción de metano, significa un incremento de la bio-disponibilidad de sustrato. Mientras que un aumento en el ritmo de producción de metano es resultado de una conversión más rápida de él/los sustrato(s) involucrados en el paso limitante de la conversión. El principal efecto observado en el trabajo de Cirne y colaboradores fue que la hidrólisis enzimática mejorada ayudó a reducir la duración de la etapa hidrolítica. El principal inconveniente de la utilización de bioaumento en condiciones anaeróbicas es la acumulación de LCFAs, que puede inhibir el proceso de digestión [15]. Se encontró que la inhibición de la producción de metano causado por la acumulación de LCFA es más importante que la inhibición debida a la acumulación de ácidos grasos volátiles [16]. En vista de esto, el efecto del bio-aumento del proceso con un microorganismo anaeróbico lipolítico en lugar de sólo la enzima es una alternativa interesante. El bio-aumento ofrece la posibilidad de producción de enzimas durante un periodo de tiempo más largo siempre que el microorganismo añadido sea capaz de competir con los otros microorganismos presentes en el reactor. Esto podría ser ventajoso para la hidrólisis de los lípidos una vez que los efectos de inhibición de LCFA comienzan a disminuir.

Otra ventaja del bio-aumento es la posibilidad de mejorar la conversión de LCFAs. Los resultados de estos experimentos muestran un efecto positivo cuando la biomasa con bacterias lipolíticas activas y el inóculo metanogénico fueron agregados desde el principio: se obtuvo una mayor producción de metano, una mayor concentración de palmitato y patrones similares de AGVs, por lo tanto, la hipótesis de que la cepa utilizada para el bio-aumento mejora la tasa de oxidación de LCFAs parece factible [16].

Los resultados de un estudio cinético de la influencia de la concentración de LCFA asociado a biomasa sobre la producción de metano, indicaron que para concentraciones debajo de 1000 mg DQO-LCFA g⁻¹ VS (VS: Volatile solids), no hubo inhibición del índice de producción de metano [50]. Por lo tanto, a concentraciones de LCFA por debajo de este límite, la tasa de producción de metano se espera que aumente junto con el aumento de la concentración de LCFA asociada a la biomasa. La tasa de producción de metano superior podría ser una consecuencia de la mejora de la β -oxidación, resultando en una alta concentración de palmitato con una simultánea liberación de hidrógeno, que es consumido por metanógenos hidrogenotróficos.

El efecto de la utilización del bio-aumento como una estrategia para mejorar la digestión de los lípidos en aguas residuales produce una disminución en el tiempo requerido para la digestión. Se reportó una reducción de 5% en el tiempo de digestión se para la digestión de aguas residuales de matadero después de un pre-tratamiento enzimático con lipasa pancreática. En este caso, al alcanzar el 80% de la producción de metano el tiempo de digestión fue un 30% aproximadamente menor [37].

BASES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

Las técnicas de biología molecular independientes cultivo pueden evitar los problemas asociados con el cultivo selectivo y el aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales, sin pasar por el llamado “great plate count anomaly”. Dado que se ha demostrado que mediante aislamiento in vitro de los microorganismos, solo se logra observar menos del 1% de la diversidad total presente. Dos tipos diferentes de células contribuyen a esta mayoría silenciosa pero activa: (i) especies conocidas para las que las condiciones de cultivo aplicadas no son las adecuadas o que han entrado en estado no cultivable y (ii) especies desconocidas que nunca han sido cultivadas antes por falta de métodos adecuados [2, 67, 81].

Los estudios filogenéticos han mejorado la perspectiva sobre la diversidad microbiana en las últimas décadas. En árboles filogenéticos basados en secuencias de genes se puede articular el concepto elusivo de la biodiversidad. Los análisis comparativos de las secuencias correspondientes a la subunidad pequeña del ARNr 16S o 18S y otras secuencias de genes demostraron que los seres vivos se dividen en tres dominios primarios: Bacterias, Eucarya, y Archaea [78]. Basándose en estos árboles filogenéticos de ARNr, se ha probado que la mayoría de la biodiversidad de la Tierra es microbiana. Los resultados de la aplicación de estos métodos a un número de entornos diversos confirman que nuestra visión de la diversidad microbiana es limitada y apuntan al estudio de una gran riqueza [44].

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

Ésta es una técnica molecular desarrollada para el rápido análisis de la diversidad de comunidades microbianas en distintos ambientes. En esta técnica uno de los dos cebadores utilizados en la reacción de PCR está marcado en el extremo 5' por un fluoróforo. El producto de PCR se digiere con una enzima de restricción, y el pool de fragmentos terminales de restricción marcados con el fluoróforo se separan mediante

electroforesis capilar en un secuenciador automático de ADN (**Figura 8**). Este equipo separa y detecta los distintos fragmentos terminales (T-RF), de acuerdo a su longitud con una adecuada selección de los cebadores de PCR y enzimas de restricción, es posible distinguir las diferentes especies en una comunidad bacteriana. El método es rápido y permite obtener perfiles (huellas dactilares) que representan la composición de las comunidades de las muestras.

Análisis de las comunidades bacterianas complejas utilizando T-RFLP revelan altos niveles de diversidad de especies. T-RFLP es una poderosa herramienta para la evaluación de la diversidad de comunidades bacterianas complejas y para la rápida comparación de la estructura de la comunidad y la diversidad de los diferentes ecosistemas [32].

El análisis del gen del ARNr 16S de de Bacteria y Archaea por T-RFLP es comúnmente utilizado para monitorear la dinámica de la población en reactores metanogénicos [17, 69].

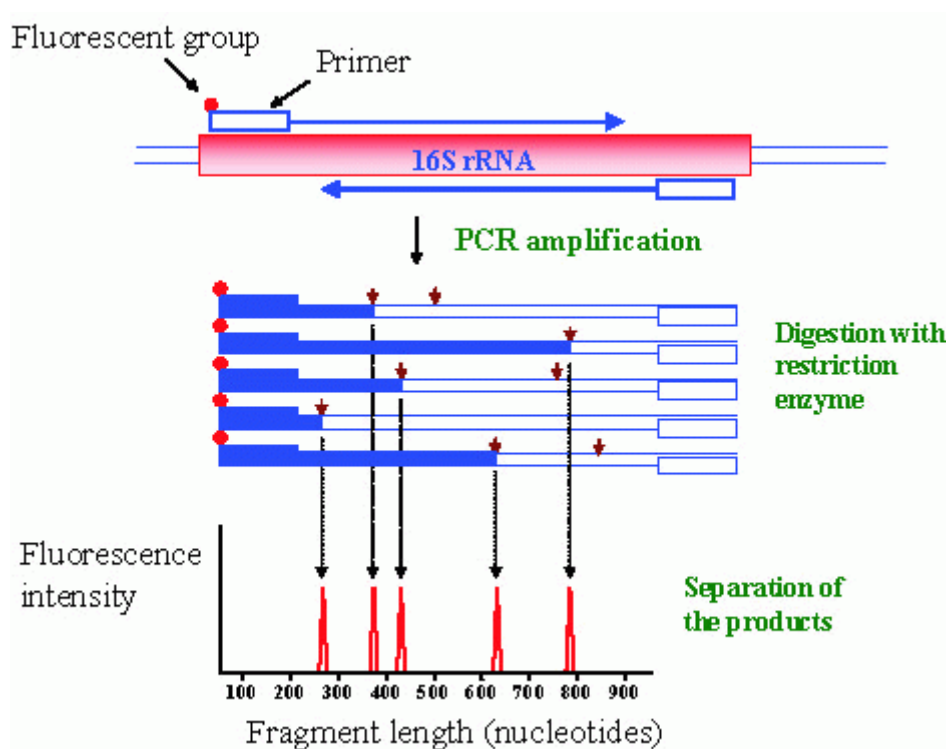


Figura 8. Esquema de T-RFLP tomado de la página web <http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method>

Nested PCR

En esta variante de PCR, el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con primers que se ubican dentro del primer fragmento de ADN amplificado. Este tipo de PCR es altamente específico y sirve para evitar los problemas de detección moleculares relacionados con microorganismos en baja proporción, incrementando la sensibilidad de detección. Esto se concluye en el trabajo de Vissers y colaboradores [73], donde describe un nuevo enfoque de Nested PCR destinado a mejorar la amplificación selectiva del gen 16S ARNr de arqueas en ambientes de agua dulce utilizando el análisis de electroforesis en gradiente de gel desnaturizante (DGGE). Llegan a la conclusión de que Nested PCR tiene un mejor rendimiento en ambientes de agua dulce que los enfoques directos descriptos anteriormente [73].

Análisis multivariados (análisis de componentes principales y análisis en cluster)

Estos análisis estadísticos son utilizados para interpretar cómo las comunidades microbianas reaccionan frente a cambios en distintos parámetros ambientales. Tales explicaciones requieren medir estadísticamente la diversidad de especies de una muestra modificando una o más variables ambientales como la temperatura o el pH. Esto se ha logrado a escala de laboratorio, donde las variables ambientales pueden ser controladas con precisión y el efecto de un cambio es por un solo parámetro, tal como un aumento en la temperatura, puede determinarse sobre la base de los cambios observados en la diversidad microbiana [43]. Sin embargo, tales análisis son controlados variando un solo parámetro y no explican los efectos de variables múltiples en distintas especies. Los análisis estadísticos multivariados han sido desarrollados para permitir el examen de las comunidades de los sistemas ecológicos sobre la base de la medida de la diversidad de especies. Los análisis más comúnmente utilizados en ecología microbiana

son el análisis de componentes principales (PCA), análisis de coordenadas principales (PCoA), y análisis de correspondencia (CA) [43].

El análisis de componentes principales (PCA) fue uno de los primeros métodos de ordenación desarrollado y se ha aplicado a una amplia variedad de conjuntos de datos ecológicos. El PCA se basa en la descomposición de una matriz de datos en un conjunto de valores propios y vectores Eigen que explican la varianza de la matriz en un conjunto reducido de ejes sintéticos. El poder de PCA y métodos relacionados con la ordenación es que el primer eje explica la mayor proporción de la varianza total de los datos, con más ejes que explican cada vez menos de la varianza. El número máximo de ejes sintéticos que se pueden determinar es igual al número de variables en la matriz original, sin embargo sólo los primeros dos o tres ejes son generalmente presentados debido a la simplicidad de visualizar gráficos 2D y 3D [43].

PARÁMETROS PARA DESCRIBIR COMUNIDADES MICROBIANAS

Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad

El concepto de gestión de recursos microbianos (MRM) permite correlacionar las características de la comunidad microbiana con el desempeño de un sistema. El concepto MRM describe la comunidad microbiana con tres parámetros [72]: (a) la riqueza (Rr), que refleja el número de especies dominantes, (b) la dinámica del cambio (Dy), que refleja el ritmo específico de las especies volviéndose significativas, y (c) la organización de la comunidad (Co), definido como una relación entre la estructura de una comunidad microbiana y su funcionalidad [12].

Cada uno de estos valores Rr, Dy y Co representa un score para describir una comunidad microbiana, se pueden representar en un gráfico combinado que da una

interpretación visual. La determinación de estos tres parámetros permite una interpretación ecológica y por lo tanto, una comparación del comportamiento de las diferentes comunidades microbianas, en determinadas condiciones en función del tiempo [53].

Riqueza

En la técnica molecular T-RFLP, la riqueza es representada como la diversidad de filotipos en la comunidad dada por el número de picos en el T-RFLP o el número de OTUs en biblioteca de clones [77]. A partir de un cromatograma la riqueza estará dada por el número de picos presentes (**Figura 9**) o en el caso de un biblioteca de clones por el número de OTUs.

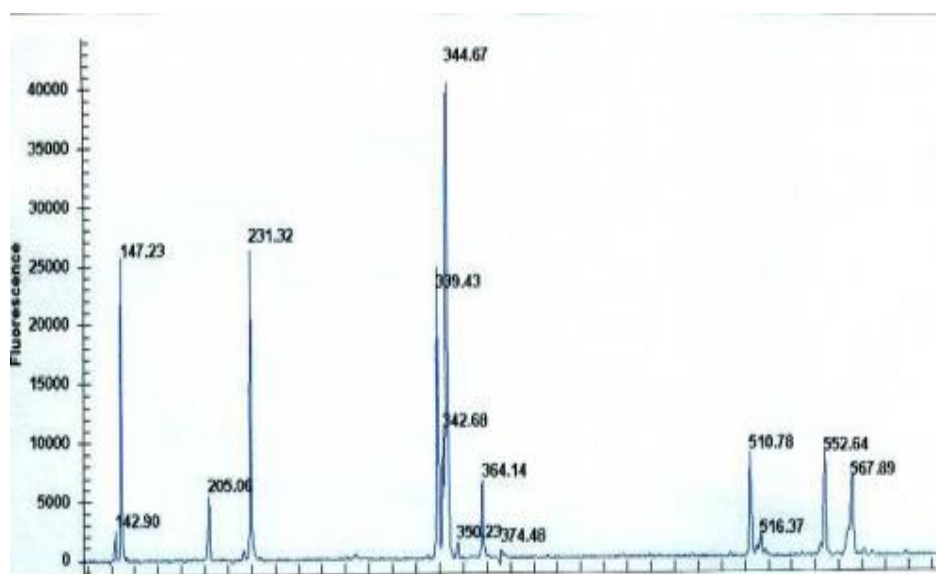


Figura 9. Electroferograma de T-RFLP, cada pico representa un tipo de especie diferente en una comunidad microbiana.

La técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) es ampliamente utilizada para estudiar comunidades microbianas. En esta técnica los fragmentos de ADN de doble cadena obtenidos por PCR se separan en un gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización (urea y formamida) y generan patrones de desnaturalización [41].

La distribución de bandas puede ser correlacionada con el porcentaje del gradiente de desnaturalización del gel que se necesita para representar la diversidad total de la muestra, a continuación, puede ser correlacionada con las características del medio ambiente analizadas. De hecho, si el medio ambiente es muy habitable, puede albergar una gran cantidad de diferentes microorganismos y también por ende gran variabilidad genética, por lo tanto, sería necesario un gradiente más amplio para describir la diversidad microbiana total. Por otro lado, si el entorno es adverso o exclusivo, menos microorganismos serán parte de la comunidad microbiana y por lo tanto una diversidad más estrecha. El porcentaje de contenido en GC bacteriano del gen de rRNA de 16S oscila entre 45% a 65%. Por lo tanto, cuanto más amplia la capacidad de carga de un entorno (el número de individuos presentes), mayor es la probabilidad de que puede alojar un gran número de bandas con una amplia variabilidad de GC (Tanto en términos de porcentaje como en términos de posicionamiento de los tramos GC en el gen 16S ARNr) [34]. Este concepto se puede expresar matemáticamente mediante la definición de un índice de rango ponderado de riqueza (Rr). Rr es el total de número de bandas multiplicado por el porcentaje de gradiente de desnaturalización necesario para describir la diversidad total de la muestra analizada, de acuerdo con la siguiente fórmula

$$Rr = (N^2 \times D_g)$$

Donde N representa el número total de bandas en el patrón y Dg el gradiente desnaturalizante compuesto entre la primera y la última banda observada [34].

Aunque el 95% de los estudios experimentales apoyan la relación positiva entre la riqueza de especies y el funcionamiento de los ecosistemas, especialmente en los niveles más bajos de riqueza, muchos han encontrado que sólo el 20-50% de las especies son necesarias para mantener los procesos ecosistémicos biogeoquímicos [66]. Algunos trabajos demuestran que la diversidad y la identidad de las especies en una

comunidad son factores importantes para predecir la productividad de la comunidad [76, 8].

Dinámica

La dinámica representa la velocidad con que cambia la comunidad en un período de tiempo. Este es un segundo parámetro que se puede estimar en base a procesamiento adicional de los patrones de DGGE. Se puede interpretar como el número de especies que, en promedio, tienen dominancia significativa (por encima del límite de detección de la técnica) en un hábitat dado durante un intervalo de tiempo definido. Cuantas más especies lleguen a la dominancia (por unidad de tiempo y en proporción al número ya detectado) más puede cambiar la comunidad microbiana original, y por lo tanto más dinámica puede ser la comunidad [77].

El cálculo de la tasa de cambio puede hacerse en base al coeficiente de correlación de Pearson determinado en el análisis de Cluster, según la siguiente ecuación:

Dinámica (ó % de cambio)= 100 - % de similitud,

De esta manera con los valores de porcentaje de similitud se calculan los porcentajes de cambio. Cuanto mayor sea el porcentaje de cambio entre dos puntos consecutivos de muestreo, mayor será la dinámica [77].

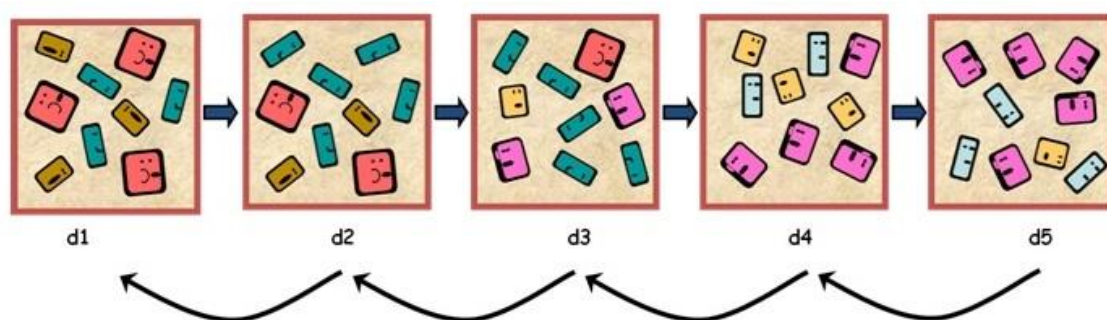


Figura 10. Se representa la velocidad con que cambia la comunidad (d) en un período de tiempo (1, 2, 3, 4,5).

Organización de la comunidad

Esta organización es el resultado de la acción de los microorganismos que más intervienen en las interacciones microbiológicas ambientales en curso. Por esta razón, tienden a ser dominantes dentro de la estructura de la comunidad microbiana [77].

Para abordar la cuestión de la relación entre la funcionalidad y la estructura de la comunidad, Fernandez y colaboradores [20], estudiaron el comportamiento de las diferentes comunidades microbianas en condiciones perturbadas. Llegaron a la conclusión de que la estabilidad de la funcionalidad no implica necesariamente la estabilidad de las estructuras de la comunidad. Se ha sugerido que la conservación de una funcionalidad dada es asegurada por la flexibilidad de una comunidad microbiana con miembros de la comunidad minoritarios que pueden llegar a ser dominantes en un periodo corto después de una perturbación significativa. Esta condición asegura una rápida recuperación a partir de una condición de estrés debido a la presencia de redundancia funcional y formas alternativas para utilizar el flujo de energía [20]. Por lo tanto, es posible definir el parámetro organización de la comunidad, como la capacidad de la comunidad para organizarse en una distribución adecuada de los microorganismos dominantes y redundantes, una condición que debe asegurar el potencial de contrarrestar los efectos de una exposición repentina a tensión [77].

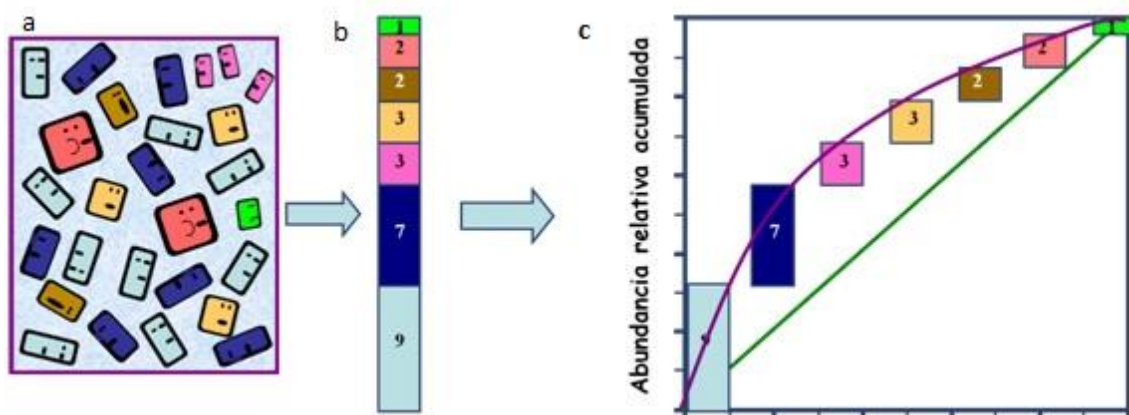


Figura 11. Representación de la estructura de la comunidad microbiana teniendo en cuenta el concepto de Pareto de distribución del trabajo. a) Representación de la comunidad microbiana conteniendo 7 especies. (b) Número de

representantes por filotipo. (c) proporción acumulada de especies, el área debajo de la curva de Pareto es igual al Co (Gini)

Antecedentes MRM y Reactores Anaerobios

En el trabajo de Carballa, 2011 [12], se correlacionaron las características de la comunidad microbiana con la funcionalidad del reactor mediante el manejo de MRM. Estudiaron cuatro reactores anaerobios continuos a escala de laboratorio (dos reactores operados en el rango mesofílico y dos termófilos). Los análisis de clúster de bacterias y arqueas basado en el DGGE y los perfiles T-RFLP mostraron una clara separación entre comunidades mesófilas y termófilas. Ambas técnicas mostraron que la comunidad bacteriana era más rica que la de arqueas independiente de la temperatura, y que las comunidades mesófilas eran más ricas que las termófilas. La organización de la comunidad de arqueas fue más desigual que la organización bacteriana, y ambas presentaron mayor desigualdad en reactores mesófilos. La dinámica de la comunidad se calculó cada 18 días, siendo muy dinámica para ambas comunidades de bacteria y arquea durante todo el experimento. En general, se observó que comunidades de arqueas y mesófilos fueron menos dinámicas que comunidades de bacterias y termófilos, respectivamente [12]. Además se correlacionó el comportamiento general de la comunidad microbiana anaerobia para procesar la eficiencia por medio de herramientas y parámetros propuestos por MRM. Se utilizó el Índice de Ripley (que mide la acumulación de ácidos orgánicos), para evaluar el proceso de estabilidad. Bioreactores con valores bajos de Ripley (y por lo tanto un buen rendimiento en metano) normalmente tenían también valores bajos de Co y altos de Rr, lo que indica que una asociación uniforme y rica de bacterias se correspondía con una buena conversión de los ácidos grasos en metano. Wittebolle y colaboradores [77], encontraron también que la uniformidad inicial de la comunidad es un factor clave en la preservación de la estabilidad funcional de un ecosistema contra el estrés ambiental.

En el trabajo presentado por Pycke [53], se describe la riqueza, dinámica y organización de la comunidad microbiana de los dominios de Bacteria y Archaea de cuatro digestores anaeróbicos a gran escala durante un periodo de 45 días, utilizando la técnica molecular T-RFLP. Los análisis en clúster separaron los perfiles obtenidos de las muestras de reactores mesófilos y termófilas para las comunidades de arqueas como para bacterias. Independientemente de la temperatura de funcionamiento, cada reactor tuvo un perfil de comunidad diferenciada. Se encontró que la estructura de la comunidad de arqueas del reactor UASB mesófilo fue más estable. La composición de la comunidad fue altamente dinámica para bacterias y arqueas. Este estudio ilustra que las comunidades microbianas en digestores anaerobios a gran escala son únicas en cada reactor y que las comunidades son muy dinámicas [41].

ANTECEDENTES DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO ESTUDIADO

En este trabajo se realizó el monitoreo de un sistema a escala real de tratamiento de aguas residuales de una industria láctea de Melo, Uruguay. El sistema fue diseñado para una alta eficiencia en remoción de grasas, consiste en dos reactores UASB modificados (A y B) y un digestor de grasas. Los reactores UASB modificados incluyen un extractor de espumas y un sedimentador externo de láminas, de esta forma se recuperan los lodos que se flotan con la grasa que pasan al digestor de grasas. Este digestor tiene una recirculación hacia los reactores UASB de manera de recuperar la biomasa perdida.

Las aguas residuales de esta industria láctea tienen un contenido de lípidos superior a 40% de DQO total y el caudal medio es de 100 m³/d. Los reactores fueron inoculados con lodo de una laguna de tratamiento anaeróbico de un frigorífico cárnico, que poseía una actividad metanogénica específica de 0,12 gCH₄-DQO /gVSS.d [46]. El digestor de grasas se inoculó con lodos de la misma laguna que los reactores, y fue operado en

condiciones de mezcla completa con recirculación de lodos por medio de bombeo. La corriente de salida del digestor se descarga en los dos rectores UASB a fin de retener la biomasa del sistema. El biogás generado se utiliza para aumentar la temperatura del flujo de ingreso al reactor en unos 3-4°C, además de mantener los contenidos digestores a temperaturas entre 32°C y 38°C. Para aumentar la temperatura del afluente y del contenido del digestor se utilizan intercambiadores de calor de tubos concéntricos contruidos en acero inoxidable.

En el trabajo de Passeggi [46], fueron estudiados los parámetros de rendimiento de este sistema de tratamiento, esto se hizo mediante el control de la remoción de materia orgánica y de grasa y aceites. Los resultados indicaron la viabilidad de realizar el tratamiento de efluentes industriales de productos lácteos sin la necesidad de separación previa de grasas en reactores anaerobios, incluso cuando el contenido de material lipídico es mayor a 40% de materia orgánica, expresada como demanda química de oxígeno (DQO).

Los valores de la eficiencia de remoción de la DQO en condiciones estables de funcionamiento fueron de alrededor del 90% para estos reactores anaerobios [46].

En otro trabajo donde se estudiaron digestores anaerobios UASB, los valores de la eficiencia de remoción del DQO están entre 83-91% [55].



Figura 12. Reactores anaerobios metanogénicos para el tratamiento de efluentes de la industria lechera en estudio.

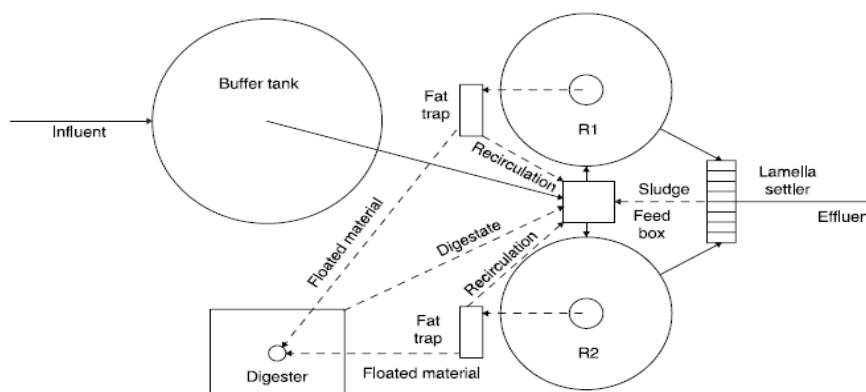


Figura 13. Sistema completo de tratamiento lay-out. (—) Flujo continuo; (---) Flujo intermitente. En este trabajo R1 es llamado reactor A y R2 reactor B. Tomado del trabajo de **Passeggi et al., 2009 [46]**.

Tabla 2. Características promedio del efluente para los reactores A y B. Tomado del trabajo de **Passeggi et al., 2009 [46]**.

Reactores	Volumen (m3)	SSV (mg/L)	Carga (kgDQO/m3.d)	Temp. (°C)	Residencia hidráulica (hs)
A B	40	710	5.5	25.8	17

Los reactores se operaron al inicio con alimentación intermitente (3 días de alimentación, 3 días de no alimentación) durante el período de arranque 120 días, alcanzando el nivel total de aguas residuales generadas por la planta a los 160 días después de la puesta en marcha. Para mantener una operación continua en el proceso global los dos reactores se operaron en forma alternada. La alimentación discontinua es una estrategia sugerida para el arranque de reactores con alto contenido en grasas [42]. Los reactores UASB se operaron con alimentación intermitente durante un año, luego del cual se pasó a alimentación continua.

El sistema de tratamiento se encuentra operando desde hace más de cinco años con buena eficiencia de remoción de materia orgánica y producción de metano. Sin

embargo, en los últimos años, se observó una disminución en la capacidad de remoción de grasas y aceites. Para buscar soluciones a este problema los encargados de la planta resolvieron agregarle a uno de los reactores UASB (reactor A) un preparado comercial hidrolítico diseñado para aumentar la remoción de grasas en sistemas de tratamiento de efluentes anaerobios. El otro reactor (reactor B) se operó sin ningún agregado como testigo para evaluar la eficiencia del suplemento.

Agregado de preparado hidrolítico al reactor A

Se agregó el preparado comercial BIO-SYSTEMS B120. De acuerdo a la descripción de este preparado (<http://biobugs.com>) contiene microorganismos de alto rendimiento adaptados y desarrollados para su uso en el tratamiento biológico de aguas residuales de grasas y aceites en digestores anaerobios. Contiene además depresores de tensión superficial y penetrantes que sueltan y licuan los depósitos de grasa pesada, ayudando así a su biodegradación

Se comenzó a agregar producto al reactor A en la fecha 14/02/12. La dosis los primeros 10 días de tratamiento fue de 200 g/día y se continuó con la etapa de mantenimiento con 20 g/día durante 120 días. El porcentaje de preparado agregado al reactor A fue de 0,55% con respecto a la biomasa total (**Tabla 3**).

Cálculo de preparado agregado al reactor A		
Reactor A	V _{total} (L) en el reactor	40000
	Biomasa en el reactor (g/L)	20
	Biomasa total en el reactor (g)	800000
Agregado del preparado	2kg en 10 días	2000
	20 g/día por 120 días	2400
	Total de preparado agregado	4400
% del preparado agregado al reactor A respecto a la biomasa total		0,55

Tabla 3. Cálculos del porcentaje de agregado del preparado hidrolítico al reactor A con respecto a la biomasa total.

El reactor B se mantuvo como testigo y se operó sin ningún agregado durante todo el período de estudio. Para evitar la mezcla de biomasa de los reactores se cerró la recirculación de biomasa del digestor de grasas durante el período de agregado de suplemento.

2. OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo general

Determinar el efecto del agregado del preparado comercial hidrolítico sobre la comunidad microbiana de reactores metanogénicos UASB de tratamiento de aguas residuales de la industria láctea.

Objetivo específicos

Determinar la variación de la comunidad microbiana de Bacteria y Archaea a lo largo del tiempo en dos reactores metanogénicos operados en paralelo.

Determinar los parámetros Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad de las comunidades microbianas de bacteria desarrolladas en los dos reactores en los diferentes períodos de operación.

Comparar la comunidad microbiana de Bacteria y Archaea con y sin agregado de preparados comerciales hidrolíticos.

Correlacionar los datos de operación de los reactores con la composición de la comunidad microbiana.

Preguntas a responder

¿Es beneficioso agregar preparados comerciales con enzimas hidrolíticas a reactores metanogénicos de la industria láctea?

¿Cómo varía la comunidad microbiana del reactor metanogénico a lo largo del tiempo?

¿Cómo varía la comunidad microbiana luego del agregado de enzimas a lo largo del tiempo?

¿Cómo afecta la composición de la comunidad de Bacteria y Archaea el agregado de enzimas?

¿Cómo se correlacionan los datos de operación del reactor con los cambios en la comunidad microbiana?

Estrategia experimental

Se realizó el monitoreo de los dos reactores metanogénicos UASB operados en paralelo. Los reactores se operaron en dos períodos, en el período I no se agregó ningún suplemento, en el período II a uno de los reactores se le agregó un suplemento comercial para aumentar la hidrólisis. Se tomaron muestras de la biomasa de los reactores a intervalos de 15-30 días durante 1 año. Cada muestra tomada fue producto de la mezcla de 6 submuestras que se homogeneizaron en una sola muestra (**Tabla 4**) y fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Se realizó el análisis de las comunidades microbianas mediante T-RFLP del gen del ARNr 16S de Bacteria (**Anexo 6.2**) y Archaea (**Anexo 6.3**), y Nested PCR para Archaea (**Anexo 6.4**). Basados en estos perfiles se realizaron análisis multivariados y se calcularon los parámetros Ri, Dy y Co.

Tabla 4. Fechas de las muestras tomadas del A (A) y del B (B), se señalan las fechas que abarca cada periodo (I: antes, y II: después del agregado del preparado hidrolítico), y un punto de acidificación en ambos reactores.

	Muestra	Fecha	Eventos importantes
Periodo I	A1, B1	06/06/11	
	A2, B2	04/07/11	
	A3, B3	08/08/11	Acidificación de A y B
	A4, B4	09/09/11	
	A5, B5	27/09/11	
	A6, B6	17/10/11	
	A7, B7	31/10/11	
	A8, B8	14/11/11	
	A9, B9	13/02/12	
Periodo II	A10, B10	27/02/12	Agregado del preparado comercial de microorganismos hidrolíticos al reactor A
	A11, B11	12/03/12	
	A12, B12	26/03/12	
	A13, B13	09/04/12	
	A14, B14	23/04/12	

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se homogeneizó la muestra utilizando un mortero estéril de manera de romper los gránulos. Posteriormente se separó las células mediante centrifugación (5000g, 5 minutos), se descartó el sobrenadante y se extrajo el ADN a partir de 1g de biomasa centrifugada utilizando el kit comercial **UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio laboratories, inc)** (**Anexo 6.1**) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se evaluó la calidad y cantidad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer de corrida TBE 0,5X. La corrida se realizó a 100V. El gel se tiñó previamente con Bromuro de Etidio (c.f. 5 µL/mL) y se observó través de un transiluminador con luz UV.

T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

Se amplificó el gen del ARNr 16S utilizando cebadores específicos para dominio *Bacteria* 27F y 1492R y para dominio *Archaea* 21F y 958R [17]. Para amplificar el gen de ARNr 16S por Nested PCR se utilizaron los primers internos 109F-938R y externos

21F-1392R [73]. Todos los cebadores fueron sintetizados por la empresa **Integrated DNA Technologies**. Los cebadores forward utilizados en el T-RFLP (27F, 21F y 109F) fueron marcados en el extremo 5' con el compuesto fluorescente 6-FAM. Las condiciones de cada reacción de PCR se presentan en **anexos 6.2, 6.3 y 6.4**.

Tabla 5. Secuencias nucleotídicas de los primers utilizados para amplificación del gen del ARNr 16S para organismos del dominio *Bacteria* y *Archaea* [17, 73].

Primers para el gen del ARNr 16S Bacteria	Primers para el gen del ARNr 16S Arquea
27F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	21F: 5'-TTCCGGTTGATCCYGCCG GA-3'
1492R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'	958R: 5'-CCGGCGTTGAMTCCAATT-3'
	109F: 5'-ACKGCTCAGTAACACGI-3'
	1392R: 5'-ACGGGCGGT GTGTACA-3'

La purificación del producto de PCR se realizó con el kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen) (**Anexo 6.5**), obteniéndose el ADN concentrado en 30 µL de agua ultrapura. El tratamiento con enzimas de restricción se realizó con la enzima *MspI* (Fermentas) para *Bacteria* (incubación 37°C por 4hs e inactivación de las enzimas a 65°C por 10 minutos) y con *TaqI* (Fermentas) para *Archea* (incubación a 65°C por 4 hs). La purificación de los fragmentos se realizó por precipitación con etanol 95% (v/v) a 4°C (por 30 minutos), y luego centrifugación a 17000g a 4°C (30 minutos), posteriormente se lavó el pellet con etanol 70% (v/v) (Se adjunta protocolo en **Anexo 6.2**) y se dejó secar en estufa a 30°C.

Separación y detección de fragmentos

Los fragmentos se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador 3130 (Applied Biosystem) equipado con un detector láser en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando el marcador interno GeneScan 1200Liz.

Análisis de los electroferogramas

Los cromatogramas se analizaron con el software Peak Scanner V1.0 (Applied Biosystem). Se estandarizaron las muestras a través del cálculo del porcentaje relativo de la altura de cada pico. Las abundancias relativas de T-RFs se determinaron mediante el cálculo de la relación entre la altura de cada pico y la altura total de todos los picos dentro de una misma muestra. Se consideraron sólo los picos con abundancia mayor al 3% del total de la suma de intensidades de la muestra. La riqueza de la comunidad fue determinada como el número de picos mayores con intensidad relativa mayor al 3% del total. La dinámica de la comunidad se determinó a partir del índice de distancia y similitud (Bray-Curtis) determinado en el análisis de Cluster. A partir de éste índice, la dinámica se calculó como (1-Similitud) entre muestras tomadas para ambos reactores cada 18 y 14 días para el periodo I y II, respectivamente para la comunidad de Bacteria y en muestras tomadas cada 28 días para la comunidad de Archaea. Para determinar la organización de la comunidad se utilizó la tabla de intensidad de T-RFs para cada muestra obtenida utilizando solamente los picos con abundancia mayor al 3% del total de la suma de intensidades. Estos valores se ordenaron de valor creciente a dec reciente para cada muestra y se calculó el coeficiente de Gini de acuerdo a lo descrito por Marzoratti y colaboradores [34].

Se realizaron análisis mutivariados utilizando el programa PAST [23].

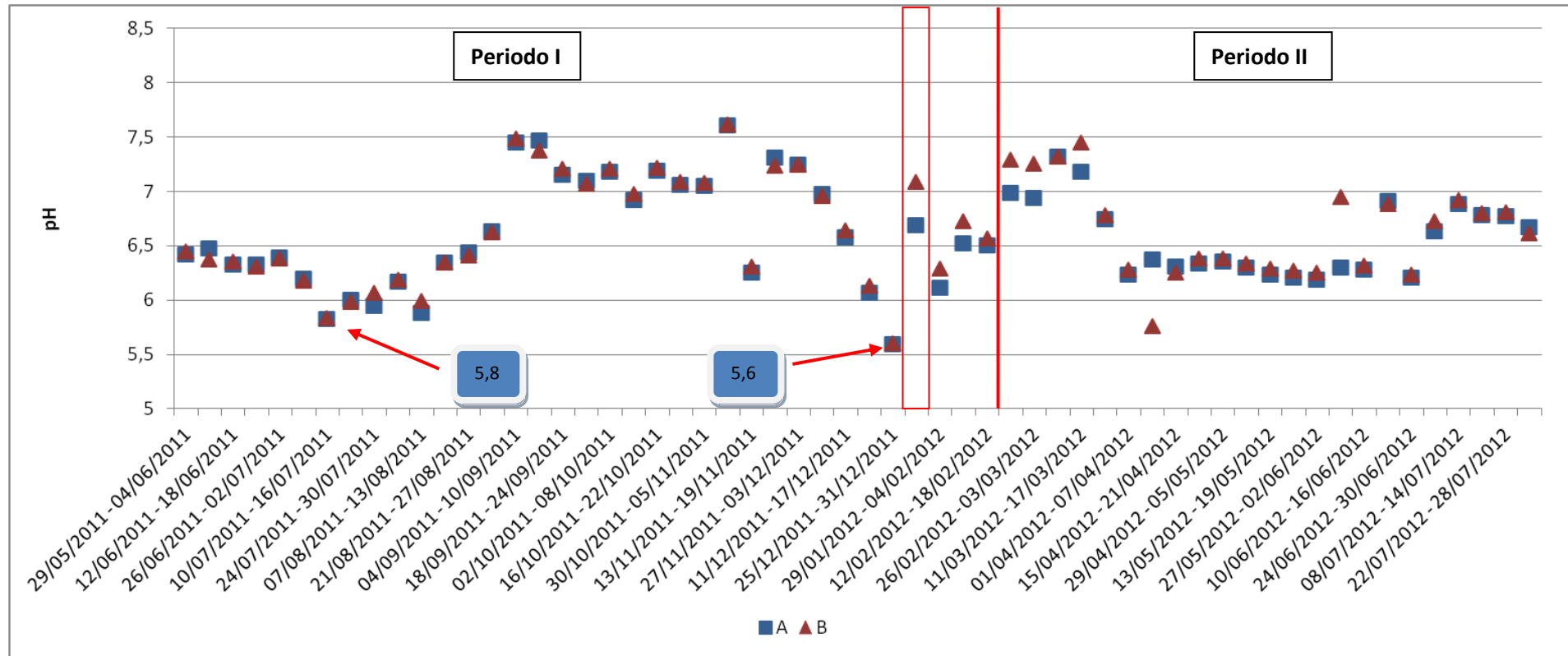
4. RESULTADOS

DATOS DE OPERACIÓN DE LOS REACTORES

Los datos de pH, DQO, biogás, remoción de grasas y aceites fueron suministrados por los técnicos de la empresa. La fábrica cursó por un período de receso en los meses de enero y febrero ya que no hubo producción de lácteos. Durante ese período no se operaron los reactores por lo tanto no se obtuvieron muestras. Los análisis de los datos se realizaron en este trabajo.

En el correr de un año de muestreo el pH varió en el rango de 5,6-7,62 (**Figura 14**). Durante el período muestreado, ambos reactores se acidificaron en dos puntos que correspondieron al período comprendido entre la fecha del 11 al 23-07-2011 (muestras A3 y B3) llegando a un pH de 5,84, y al período correspondiente a la fecha del 26 al 31-12-2011 llegando a un pH de 5,6. Los reactores mantuvieron un pH similar entre ellos tanto en el periodo I como en el II.

Datos de pH



Remoción de DQO

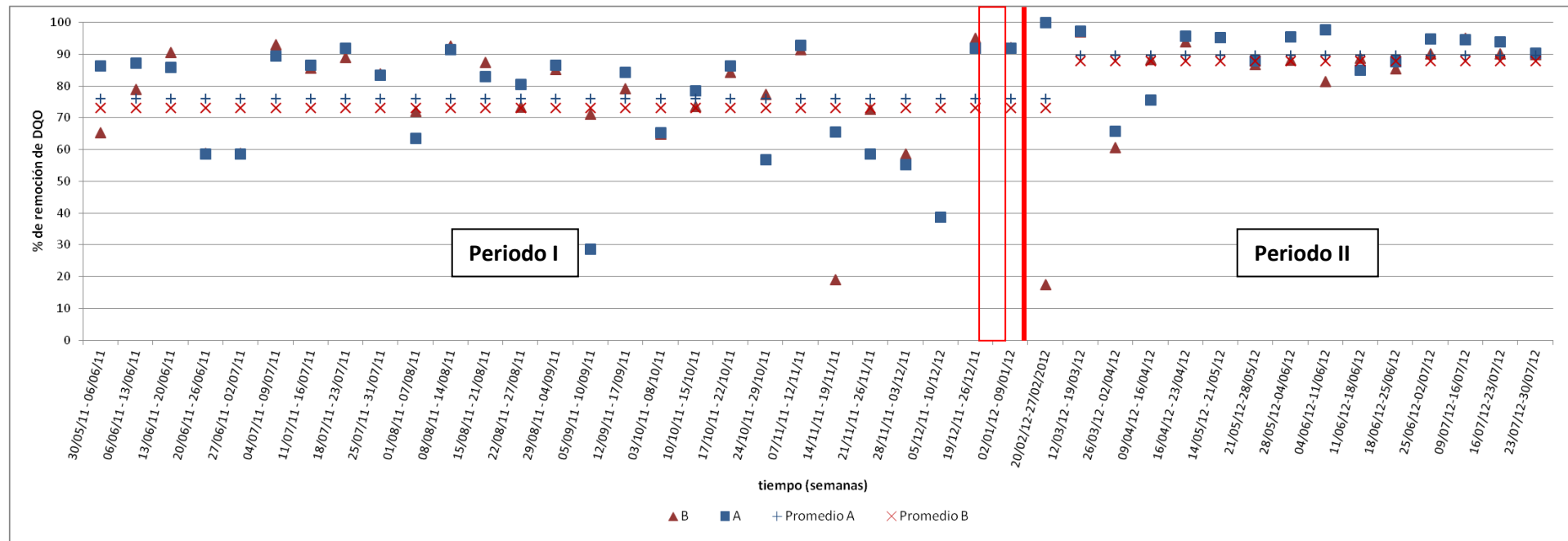


Figura 15. Promedios semanales de remoción de DQO para el reactor A y B durante el año de muestreo. Barra roja: indica el agregado del preparado hidrolítico en la fecha 14/02/2012, señala final de periodo I y comienzo de periodo II. Cuadro rojo: señala periodo de receso de la industria láctea.

La remoción de DQO para el reactor A estuvo entre 28- 92% en el periodo I y entre 56- 97% en el periodo II (**Figura 15**). Mientras que para el reactor B estuvo entre 19-92% en el periodo I y entre 17-95% en el periodo II.

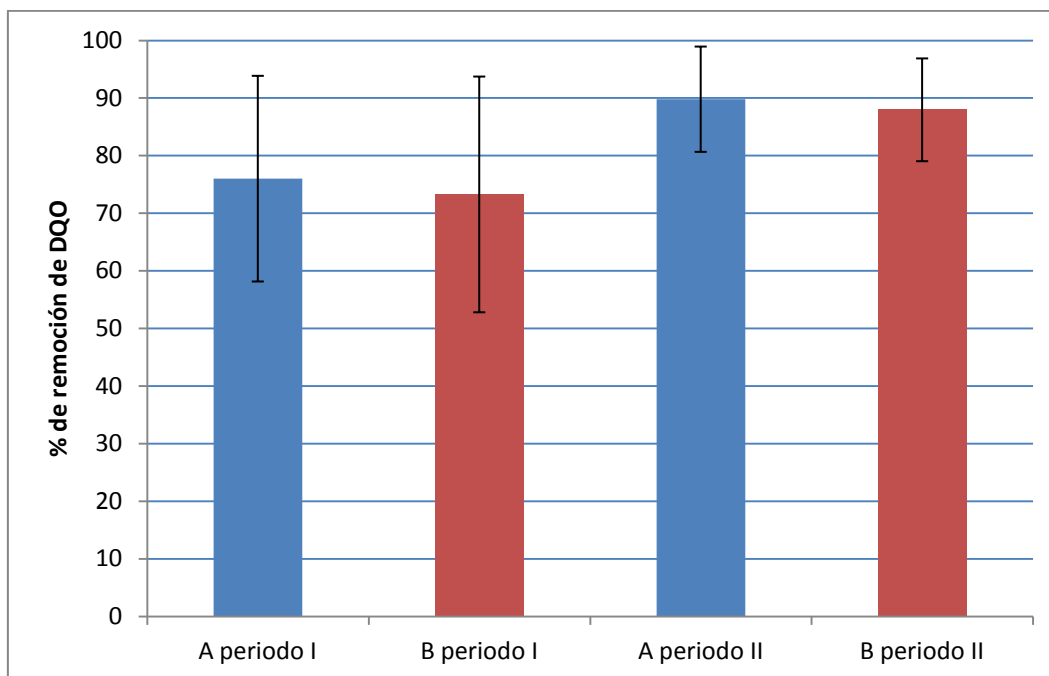


Figura 16. Porcentaje de remoción de DQO promedio para cada reactor en el período I y en el período II. Las barras indican la desviación estándar de los datos durante el período.

Los promedios de los porcentajes de remoción de materia orgánica (medida como DQO) (**Figura 16**), no presentaron diferencias significativas luego del agregado del preparado hidrolítico en el reactor A. Tampoco se observó una variación significativa para los valores obtenidos para el reactor B, si bien se ve una tendencia a incremento en los dos reactores luego del período de no operación (período II). Para ambos reactores se observó una alta dispersión de los datos.

Producción de biogás

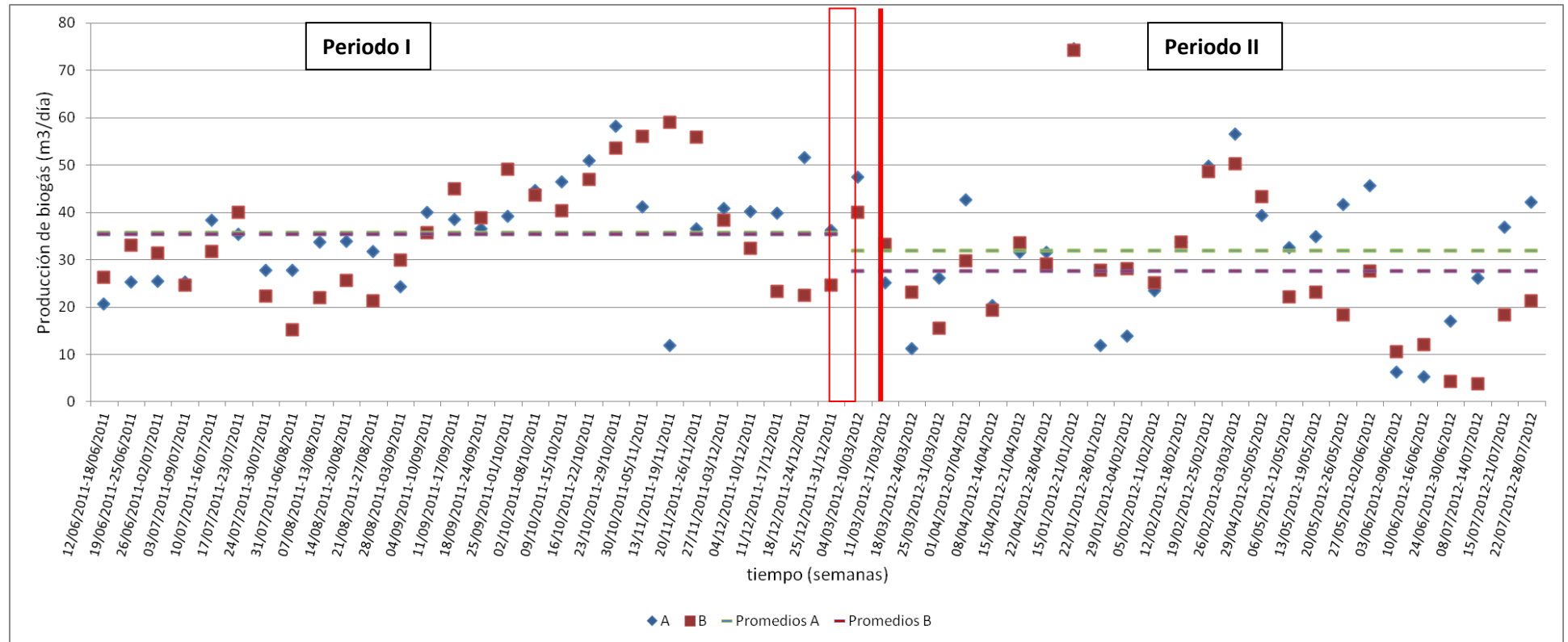


Figura 17. Gráfico de promedios semanales de los datos de producción de biogás ($\text{m}^3/\text{día}$) para los reactores A y B durante un año de muestreo. Barra roja: indica el agregado del preparado hidrolítico en la fecha 14/02/2012, señala final de periodo I y comienzo de periodo II. Cuadro rojo: señala periodo de receso de la industria láctea.

La producción de biogás fue similar y fluctuante en el periodo I para ambos reactores (**Figura 17**), en el periodo II también se observa fluctuación y valores similares en la producción de biogás para los reactores A y B.

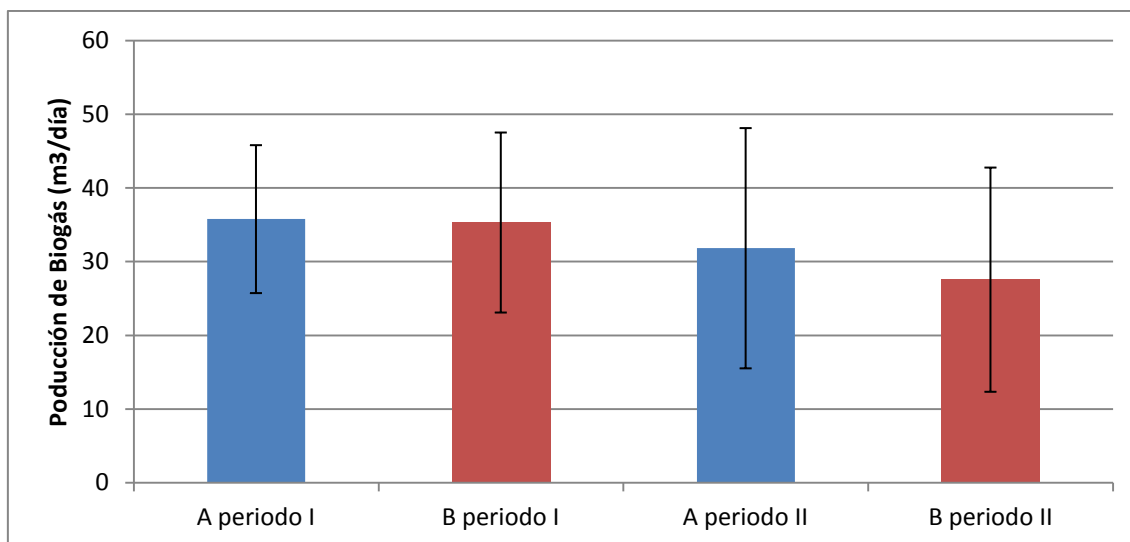


Figura 18. Producción de biogás promedio para los reactores A y B en el periodo I y II. Las barras indican la desviación estándar de los valores durante el período.

No se observaron diferencias significativas para el reactor A entre el periodo I y II, así como tampoco para el reactor B (**Figura 18**). La producción de biogás en ambos periodos entre los reactores fue similar.

Remoción de grasas y aceites

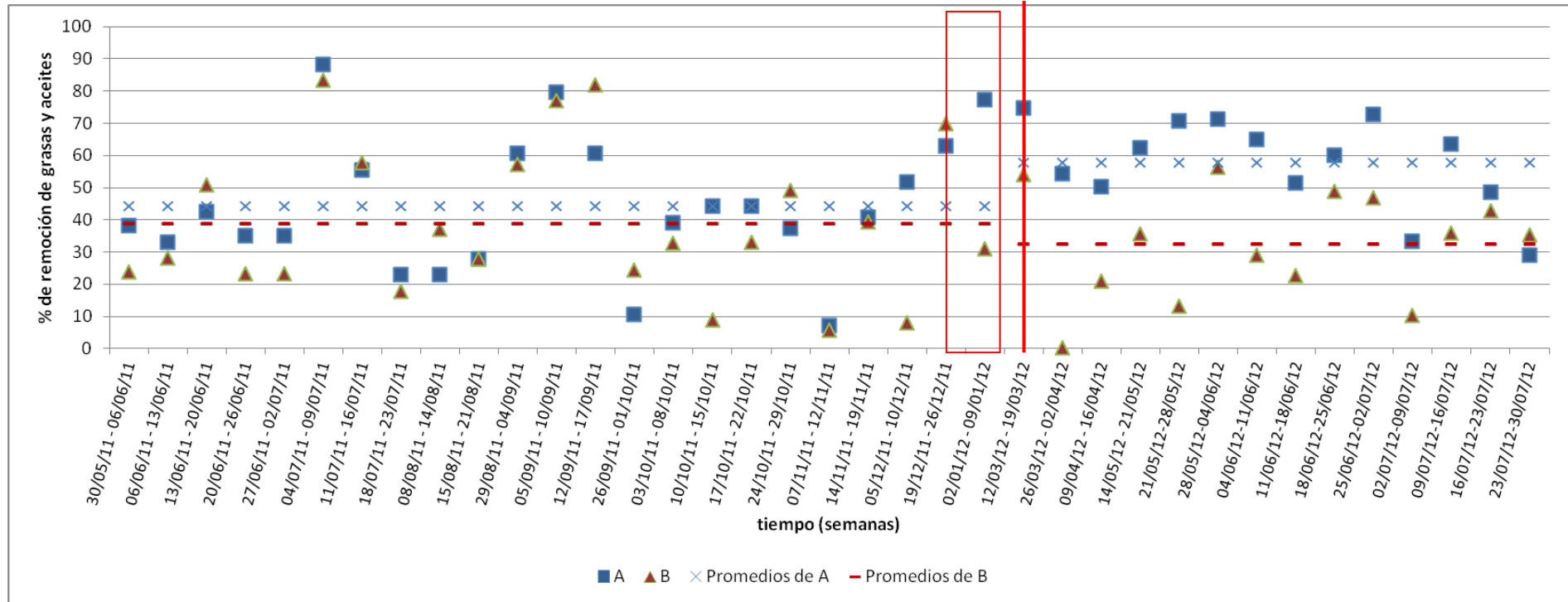


Figura 19. Porcentaje de remoción de grasas y aceites semanal para los reactores A y B. Barra roja: indica el agregado del preparado hidrolítico en la fecha 14/02/2012, señala final de periodo I y comienzo de periodo II. Cuadro rojo: señala periodo de receso de la industria láctea.

Para el reactor A en el periodo I la remoción de grasas y aceites estuvo entre 7-88% mientras que en el periodo II estuvo entre 28-75% (**Figura 19**). Para el reactor B la remoción de grasas y aceites estuvo entre 6-82% en el periodo I y en el periodo II entre 10-56%. Se observa que en el periodo I los reactores tienen una remoción de grasas y aceites similar entre ellos mientras que en el periodo II tienden a diferenciarse al principio, y luego de un tiempo la diferencia es menor. En todos los casos se observa una gran dispersión de los datos.

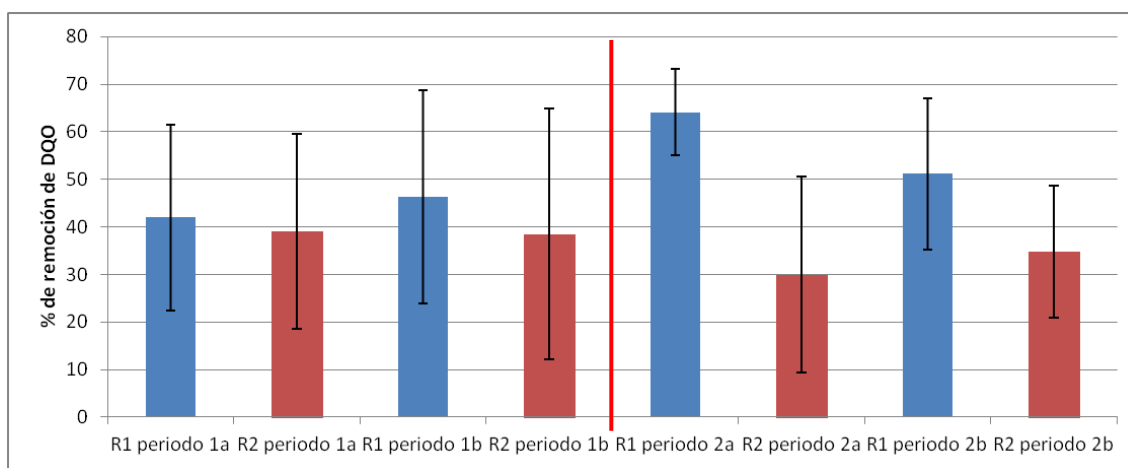


Figura 20. Promedio de remoción de grasas y aceites para los reactores A y B durante el período I y II. Cada periodo se dividió en dos partes para los dos reactores: período I en a y b, y período II en a y b. Las barras indican la desviación estándar de los datos tomados durante el período. La barra roja indica final de periodo I y comienzo del periodo II.

Debido a la gran dispersión de los datos se decidió realizar los promedios en períodos más cortos. Para eso se dividió el periodo I y II en dos partes cada uno, el periodo I con parte a y b de 11 y 12 semanas respectivamente, y el periodo II se dividió en a y b cada una con 7 semanas (**Figura 20**) en el análisis observó que para ambos reactores entre la parte a y b del periodo I no hay diferencias significativas en la remoción de grasas y aceites, siendo para el reactor A de 42% (a) y de 46% (b), mientras que para el reactor B fue de 39% (a) y de 38% (b). En el periodo IIa se observan diferencias entre ambos reactores ya que para el reactor A se da un aumento de la remoción de grasas y aceites,

los porcentajes de remoción fueron de 64% para el reactor A y de 30% para el reactor B, y en el periodo IIb esta diferencia disminuye siendo de 51% para el reactor A y de 35% para el reactor B. Debido a una gran desviación de los datos no se pueden observar diferencias entre los promedios.

Extracción de ADN de los lodos

La extracción de ADN de los lodos de ambos reactores tuvo un buen rendimiento utilizando el kit Ultra Clean Soil DNA extraction kit de MoBio. Se verificó presencia de ADN y la pureza del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (**Figura 21a**). El producto de PCR tanto para Bacteria como para Archaea del gen de ARNr 16S fue del tamaño esperado, 1500pb aproximadamente (**Figura 21b y c**).

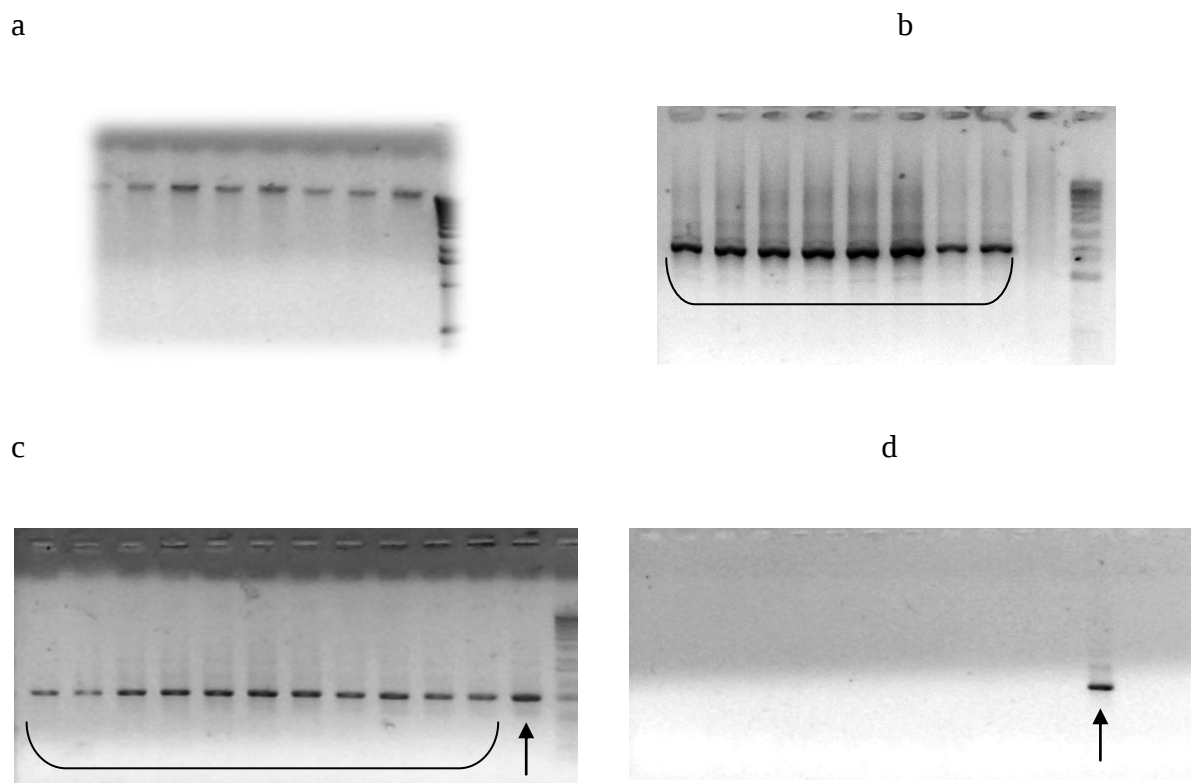


Figura 21. **a-** Gel de electroforesis que muestra las bandas de ADN genómico extraído de varias muestras de lodo para A y B, **b-** Gel de electroforesis que muestra el producto de PCR del gen de ARNr 16S para *Bacteria*, **c-** Gel de electroforesis que muestra el producto de PCR del gen de ARNr 16S para *Arquea*, **d-** Gel de electroforesis que muestra el producto de PCR del gen de ARNr 16S para *Arquea* con problemas de amplificación donde se observa el control positivo. El marcador de peso molecular de ADN utilizado

fue: 1KB (Invitrogen), y el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio. Flecha fina: control positivo arqueas. Corchete: amplicones esperados para ambos dominios.

Se obtuvo solamente productos de amplificación positivos para el gen del ARNr 16S de Archaea de las primeras 5 muestras de cada reactor, es decir hasta la fecha 27-09-2011. A partir de esta fecha no se pudo lograr amplificación con los primers de *Archaea* utilizados (21F y 1392R). Esto se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (**Figura 21d**), donde se observó la amplificación solamente del control positivo (ADN proveniente de una cepa pura perteneciente al dominio *Archaea*).

Para aumentar la sensibilidad del método se probó la técnica de Nested PCR, esta técnica comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una. Primero se realizó una reacción con los primers externos para amplificar una región de ADN más extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecutó una segunda reacción de PCR con los primers internos para amplificar la región específica. No se obtuvieron resultados positivos para ninguna de las muestras analizadas (A6, A7, A12, A14, B8, B9, B11), mientras que sí se obtuvieron resultados de amplificación positivos para el control positivo. Se extrajeron nuevamente ADN de algunas de las muestras (A6, A7, A12) para descartar que no amplificaran por problemas relacionados al ADN como degradación, pero en nuevos intentos de amplificación no se obtuvieron resultados positivos.

La ausencia de productos de PCR de organismos del dominio *Archaea* en estas muestras no refleja su ausencia en los reactores en ese momento dado. Los miembros de estos taxones podrían simplemente no ser detectado debido a un problema metodológico.

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD MICROBIANA DE ARCHAEA POR T-RFLP DEL GEN DE ARNR 16S

Debido a los problemas con el PCR para este grupo de organismos solamente se analizaron las muestras de tomadas en el período I de operación (muestras 1 a 5) por lo cual no se pudo estudiar el efecto del agregado comercial sobre este grupo de microorganismos. A pesar de ello se analizaron los datos para obtener información del proceso previo al agregado.

En los perfiles obtenidos de T-RFLP (**Figura 22**) se detectaron un total de 36 picos (T-RFs) distintos, 12 de ellos estuvieron presentes en la mayoría de las muestras, lo que indica su persistencia en el reactor.

Los perfiles obtenidos para las comunidades de ambos reactores mostraron similitud en el tipo de picos presentes, variando la abundancia relativa de cada T-RF en el tiempo.

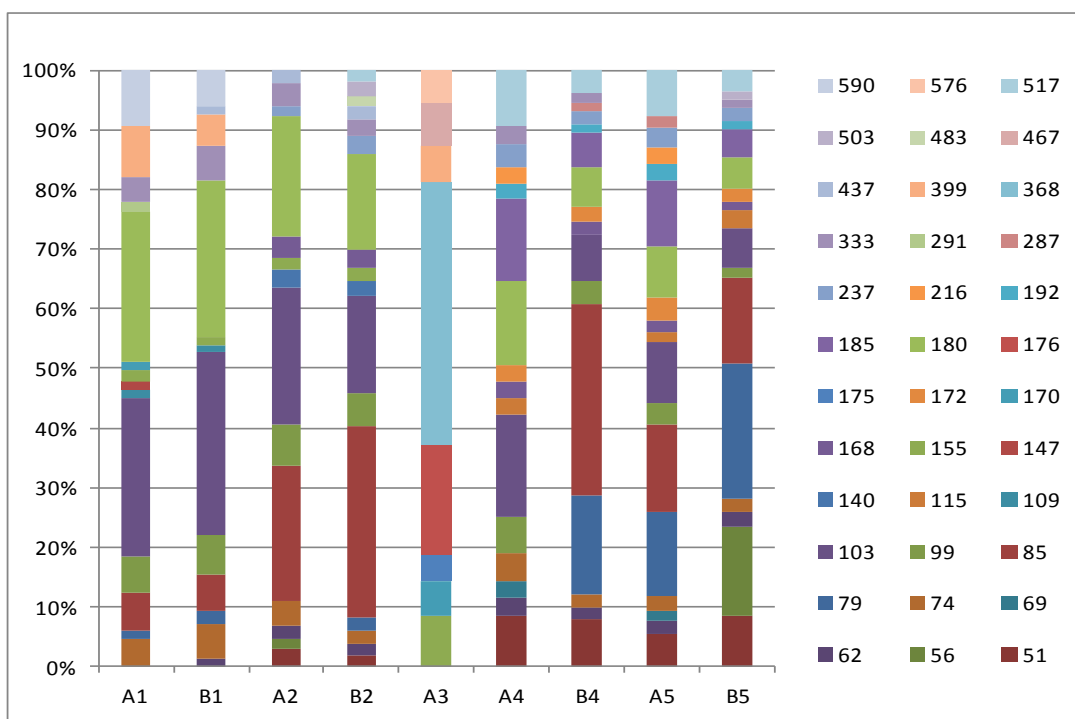
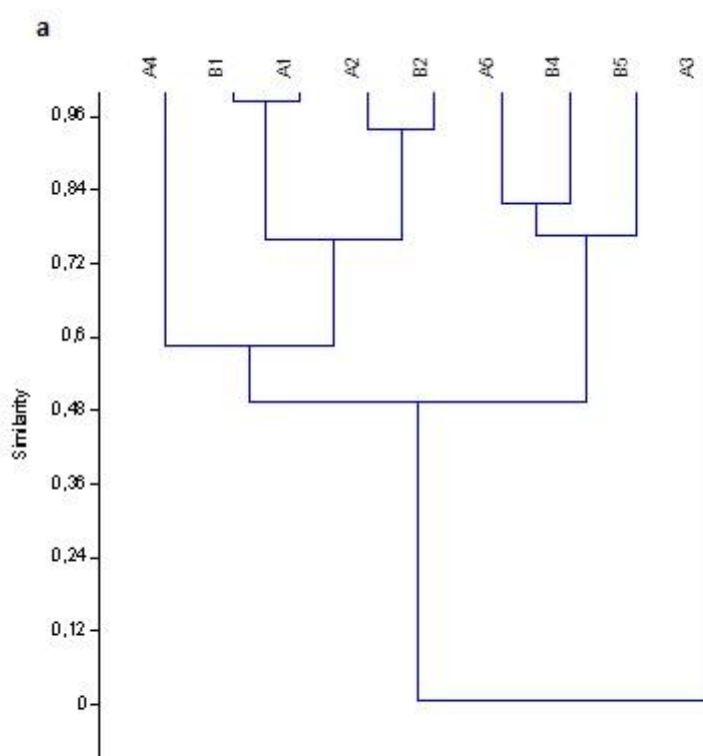


Figura 22. Abundancia relativa de fragmentos de T-RFs. Cada color indica un T-RF diferente, la proporción relativa de los picos en el cromatograma se muestra como proporción relativa de cada T-RF. El tamaño en nucleótidos de cada T-RF se especifica a la derecha de la imagen.

Análisis de clúster y de componentes principales

El análisis de agrupamiento (clúster) de los resultados de abundancia relativa obtenidos en el T-RFLP basado en similitud de Morisita mostró un agrupamiento entre las muestras de ambos reactores para la misma fecha (**Figura 23a**). La misma tendencia se observó en el análisis de componentes principales (**Figura 23b**). En ambos análisis se observó una separación de la muestra A3, esta muestra fue obtenida luego de la acidificación de los reactores. La muestra B3 no se pudo analizar por no haber obtenido resultado positivo en la amplificación del gen.



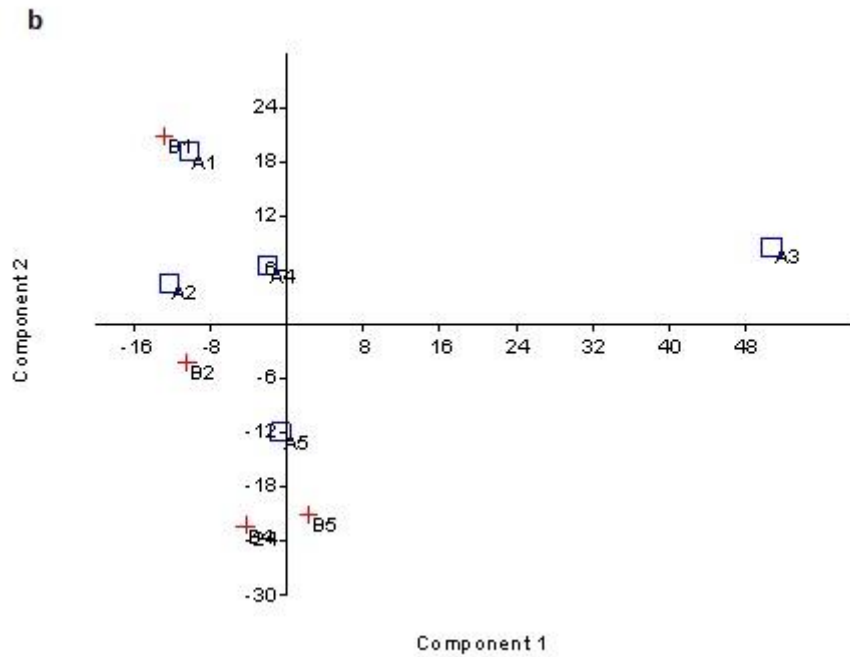


Figura 23a. Análisis de clúster basado en similitud de Morisita basado en los perfiles del T-RFLP del gen ARNr 16S de *Archaea* para muestras 1-5 para el reactor A y muestras 1, 2, 4,5 para el reactor B. **b.** Análisis de componentes principales (PCA) utilizando los perfiles de T-RFLP de *Archaea* el componente 1 explica el 46,7% y el componente 2 explica el 30,4%. Para ambos análisis se tomaron en cuenta solamente los fragmentos que aportan más de un 3% a la abundancia total.

Índices de diversidad

El índice de Simpson presenta valores menores cuando la comunidad es más diversa. De hecho la interpretación de D es que es la probabilidad de un encuentro intraespecífico, es decir, la probabilidad de que dos individuos tomados de la comunidad al azar sean de la misma especie. Cuanta más alta sea esta probabilidad, menos diversa es la comunidad. En la **Tabla 6**, se muestran los valores del índice de Simpson para la comunidad de *Archaea* del reactor A y B. Se observa que los valores, estuvieron entre 0,74 a 0,90, por lo tanto es cercano a 1, lo que indica una comunidad diversa. El índice de Shannon, H , normalmente toma valores entre 1 y 4.5. Los valores observados para

las muestras de las comunidades de Archaea de ambos reactores estuvieron entre 1,78 y 2,40 (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de diversidad para las muestras del reactor A y B

Índices de diversidad	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B4	B5
Simpson_1-D	0,81	0,81	0,74	0,90	0,90	0,79	0,76	0,80	0,85
Shannon_H	1,84	1,85	1,69	2,48	2,40	1,78	1,68	1,89	2,06

Determinación de los parámetros Ri, Dy y Co a partir de los perfiles de T-RFLP de Archaea

Riqueza de la comunidad

Se observaron entre 8 y 23 picos de T-RFLP, con un promedio de 11 picos por muestra para el reactor A, mientras que para el reactor B se observaron entre 8 y 16 picos, con un promedio de 9 picos (Figura 24). Se observó un aumento en la cantidad de picos para el reactor A en el transcurso del muestreo mientras que la cantidad de picos en las muestras del reactor B se mantuvo más estable.

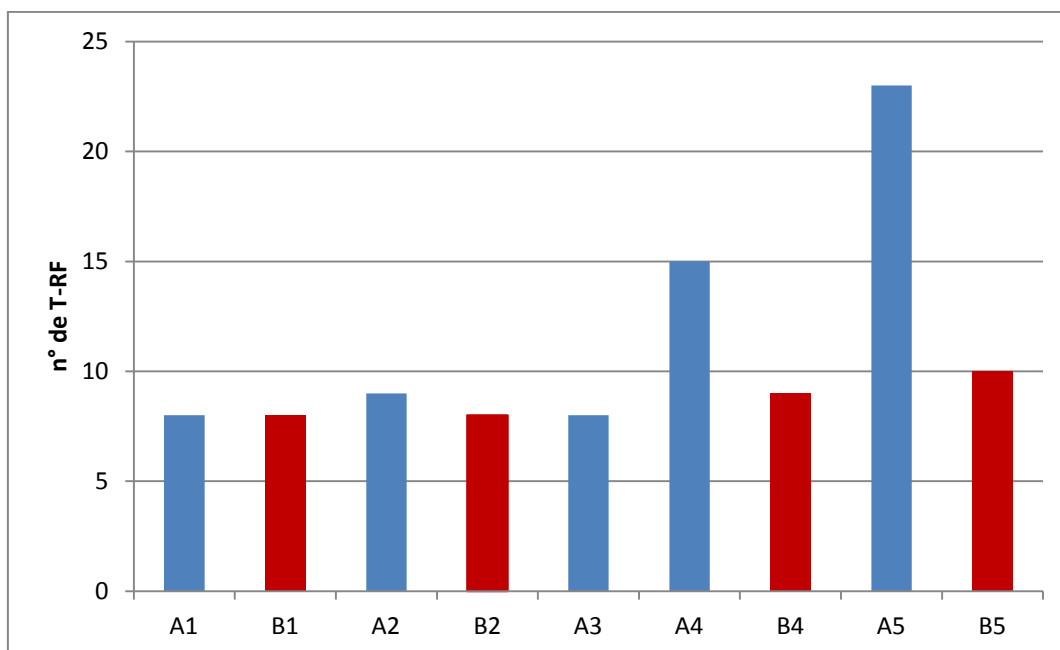


Figura 24. Riqueza de la comunidad en muestras de los reactores A y B determinada como el número de picos en los cromatogramas de T-RFLP luego de la estandarización (sólo se tomaron los picos con abundancia relativa mayor al 3%).

Dinámica de la comunidad

Para realizar el cálculo de la dinámica es necesario comprar muestras extraídas en períodos de tiempo similares. Debido a los problemas con la amplificación por PCR con estas muestras solamente se pudo calcular la dinámica con unas pocas muestras, la mayoría para el reactor A.

Se observa que la dinámica obtenida para la comunidad de arqueas del reactor A presentó una gran variación (entre 30 y 100%) (**Figura 25**). Las dinámicas obtenidas en el período previo a la acidificación presentaron valores moderados para ambos reactores (30% y 45% para reactor A y B respectivamente), mientras que las dinámicas más altas se observaron luego del período de acidificación de los reactores (cercanas al 100%, datos solo obtenidos para el reactor A).

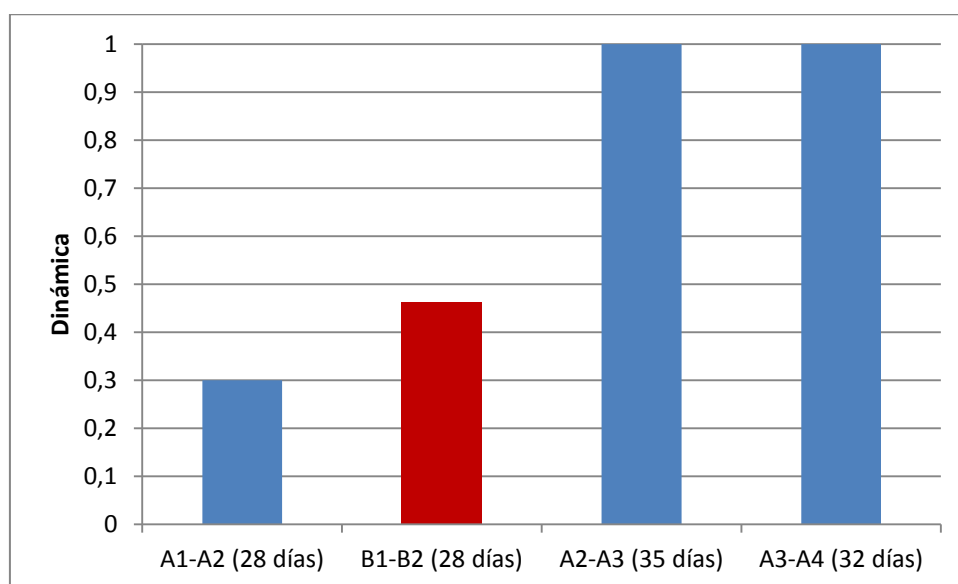


Figura 25. Dinámica mensual de las comunidades de arqueas de los reactores A y B. Solamente se analizaron muestras tomadas durante el período I.

Organización de la comunidad

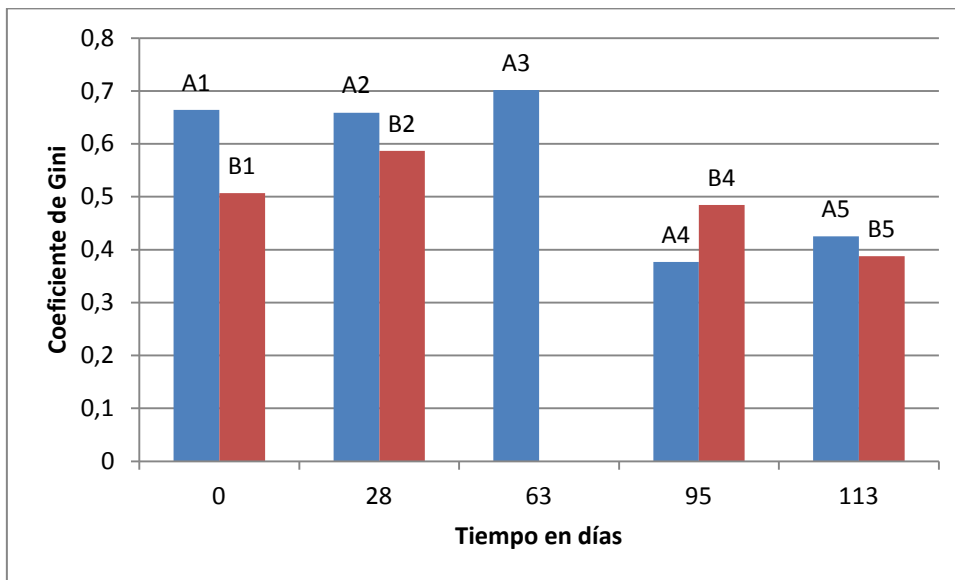


Figura 26. Coeficiente de Gini de las comunidades de arqueas de los reactores A y B en muestras tomadas durante el período I de operación. La muestra B3 no se incluye porque no se pudo obtener un perfil de esta muestra.

El coeficiente de Gini es una medida de la desigualdad de la comunidad y varía entre 0 y 1, en donde 0 se corresponde con la perfecta igualdad, y 1 se corresponde con la perfecta desigualdad. En la **Figura 26**, se observa que para el reactor A el coeficiente de Gini varió entre 0,37-0,70, mientras que para el reactor B varió entre 0,39-0,58. Por lo tanto, el reactor A tuvo una mayor desigualdad en la comunidad de Arqueas en el periodo de muestreo que el reactor B.

ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA POR T-RFLP DEL GEN ARNr 16S

En los perfiles de T-RFLP de Bacteria de las muestras del reactor A se observaron 38 picos (t-RFs), 19 de los cuales se encontraron presentes en la mayoría de las muestras, lo que indica persistencia en el reactor (**Figura 27**). Se observó un cambio de los perfiles en las muestras A9 y A10, estas muestras corresponden al re-arranque de los reactores luego del período de receso en la producción de lácteos de los meses

diciembre y enero y al agregado de enzimas hidrolíticas (en el reactor A) en la fecha 14/02/12 previa a la extracción de la muestra A10.

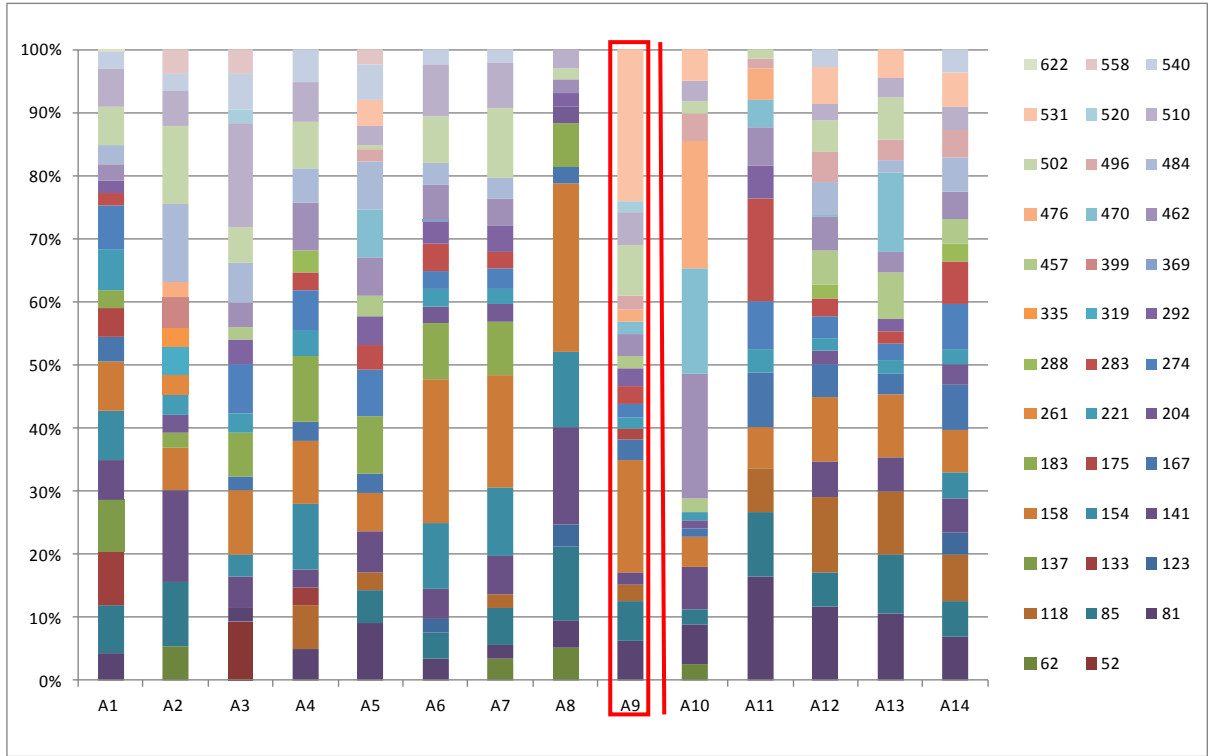


Figura 27. Representación de los perfiles de T-RFLP de Bacteria para muestras del reactor A. Cada color indica un T-RF diferente, la proporción relativa de los picos en el cromatograma se muestra como proporción relativa de cada T-RF. El tamaño en nucleótidos de cada T-RF se especifica a la derecha de la imagen. Recuadro rojo: indica la muestra tomada luego del período de receso. Barra roja indica agregado del preparado de microorganismos.

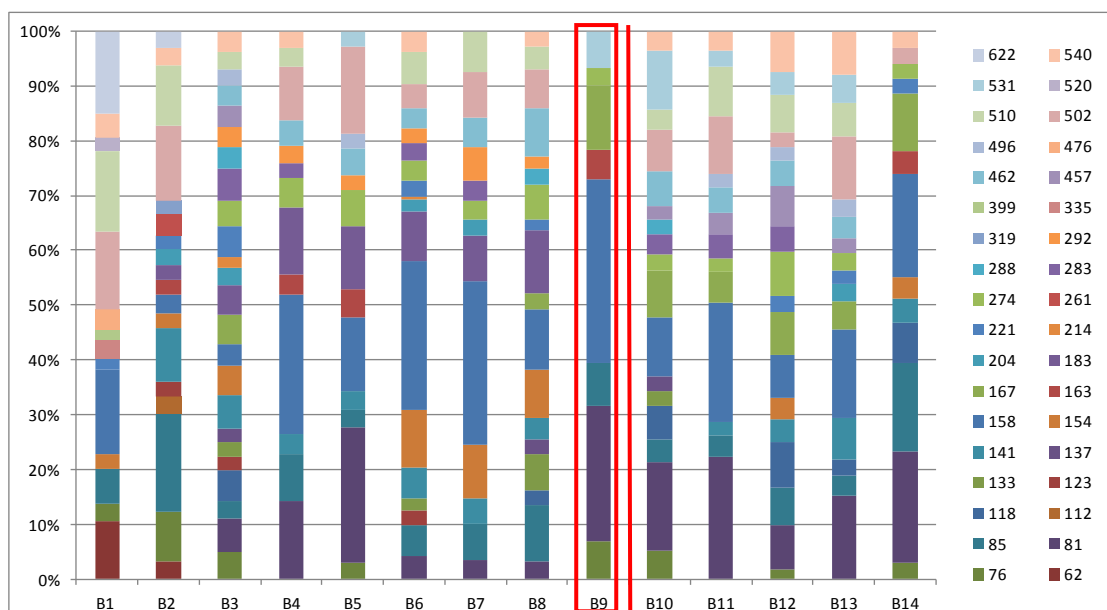


Figura 28. Representación de los perfiles de T-RFLP de Bacteria para muestras del reactor B. Cada color indica un T-RF diferente, la proporción relativa de los picos en el cromatograma se muestra como proporción relativa de cada T-RF. El tamaño en nucleótidos de cada T-RF se especifica a la derecha de la imagen. Recuadro rojo: indica la muestra tomada luego del período de receso. Barra roja indica agregado del preparado de microorganismos.

De forma similar, en los perfiles de T-RFLP de Bacteria de muestras del reactor B se observaron 36 picos, de los cuales 12 estuvieron presentes en la mayoría de las muestras, lo que indica persistencia en el reactor (**Figura 28**). También se observó un cambio en la comunidad en las muestras B9 correspondientes al re-arranque del reactor luego del receso de producción.

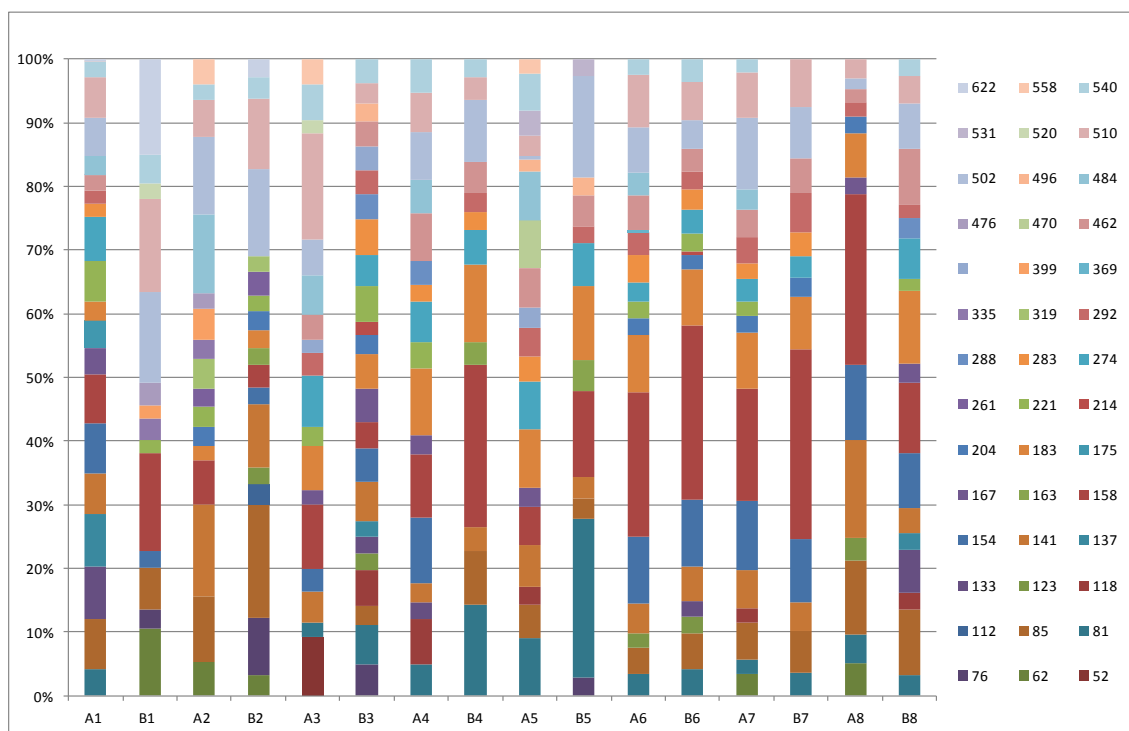


Figura 29. Representación de los perfiles de T-RFLP para las muestras de los reactores A y B extraídas durante el período I de operación (muestras 1-8).

De manera de comparar la comunidad de bacteria de ambos reactores y el efecto del agregado comercial sobre uno de ellos, se graficó en forma conjunta los perfiles de T-RFLP de los dos reactores durante el período I y durante el período II (**Figuras 29 y 30**). Durante el período I se observó similar comportamiento para las comunidades de ambos reactores, la abundancia relativa de los T-RF cambió en el tiempo mostrando un cambio a partir de la muestra 8 con respecto a las muestras anteriores. Las primeras muestras tomadas durante el período II para el reactor A (muestras A 9 y A10) muestran perfiles muy diferentes con las tomadas en el reactor B en las mismas fechas (B9 y B10), volviéndose luego más similares entre sí.

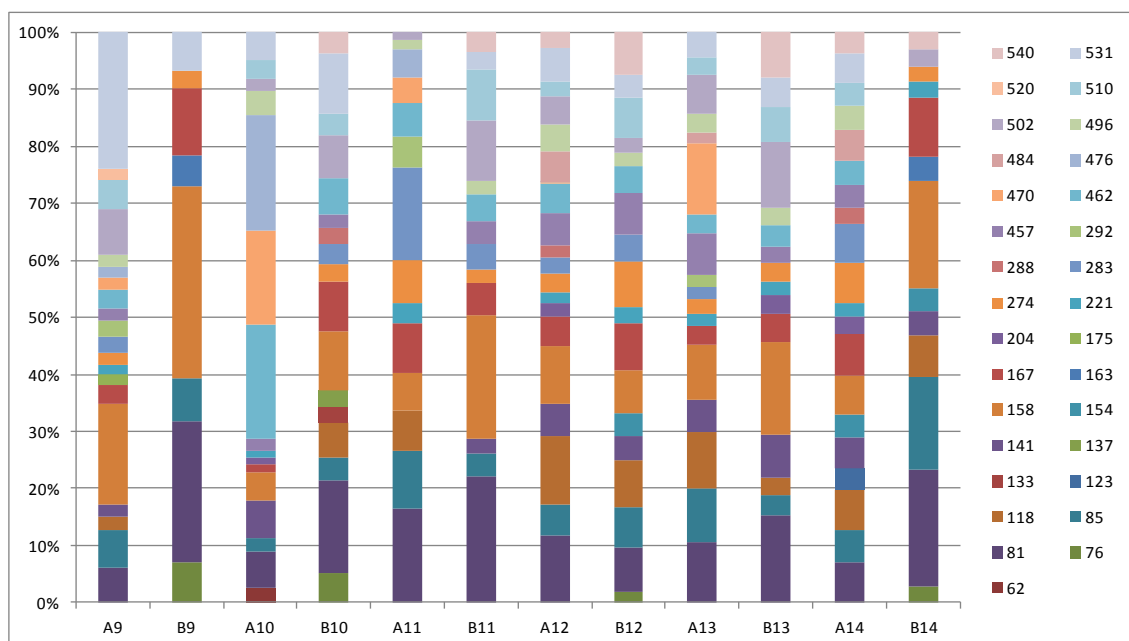


Figura 30. Comparación de los perfiles de T-RFLP de Bacteria tomadas de los reactores A y B durante el período II (muestras 9-14).

Análisis de clúster y de componentes principales

El análisis de agrupamiento (clúster), basado en similitud de Morisita de los perfiles de T-RFLP para las muestras tomadas en el período I (1-8) para reactores A y B muestra un agrupamiento de las muestras por fecha de muestreo y no por reactor (**Figura 31 a**). Mientras que en el análisis realizado para el período II se observa un agrupamiento de muestras por reactor (**Figura 31 b**). Las muestras tomadas del reactor A en las fechas más cercanas al agregado (muestras A9 y A10) se encuentran separadas de las otras muestras. En particular la muestra A10 es la que presenta menor similitud con las otras muestras.

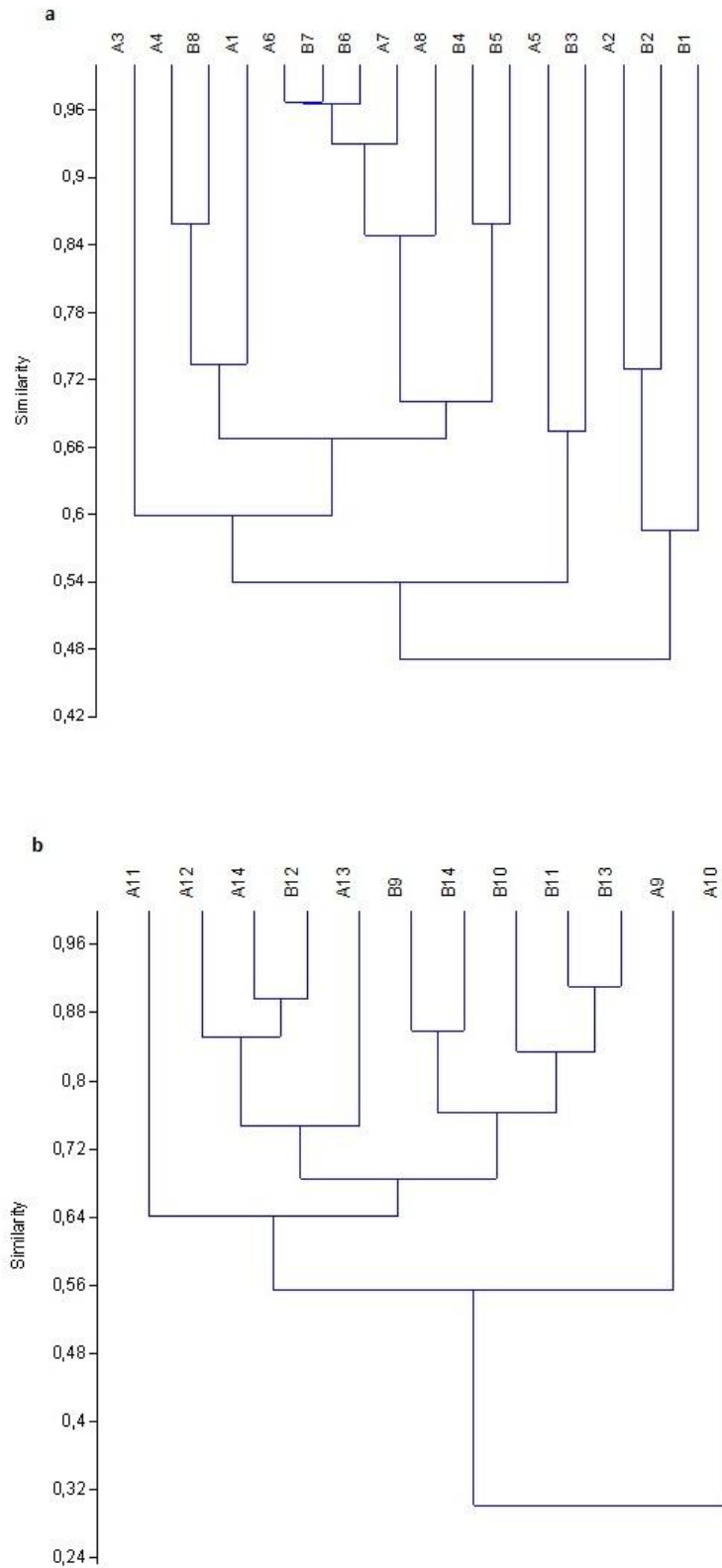
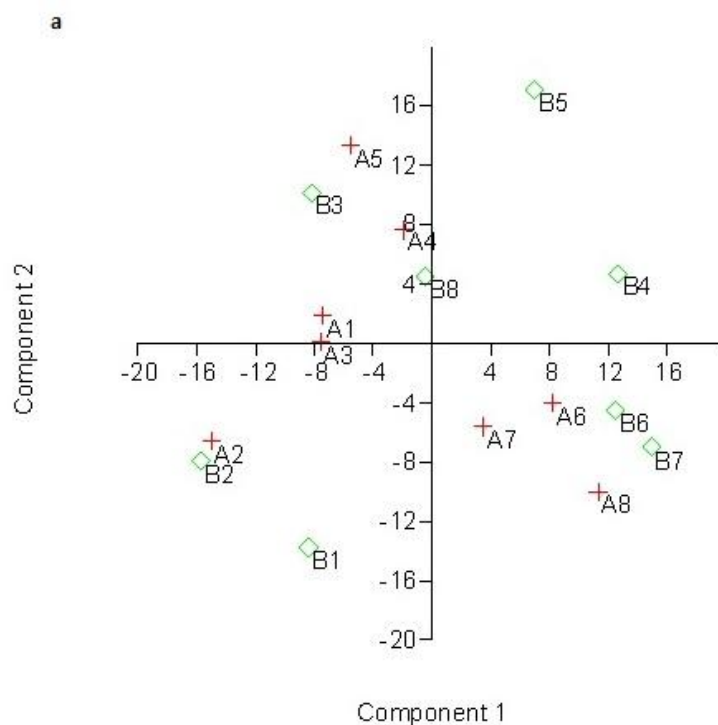


Figura 31. Análisis de clúster basado en similitud de Morisita, de los perfiles de T-RFLP del gen ARNr 16S de Bacteria para las muestras de los reactores A y B durante el período I (muestras 1-8) **(a)** y durante el período II (muestras 9-14) **(b)**.

De forma similar, el análisis de componentes principales (PCA) muestra cierto agrupamiento entre muestras por fecha de muestreo durante el primer período y un agrupamiento de muestras por reactor durante el período II (**Figura 32 a y b**). Se observa también que las muestras A9 y A10, tomadas luego del agregado comercial, son las que están más separadas mientras que luego las muestras de los dos reactores aparecen más cercanas. La suma de los dos componentes (1 y 2) explica un alto porcentaje de la variación para los dos análisis (49,3% para el período I y 57,3% para el período II).



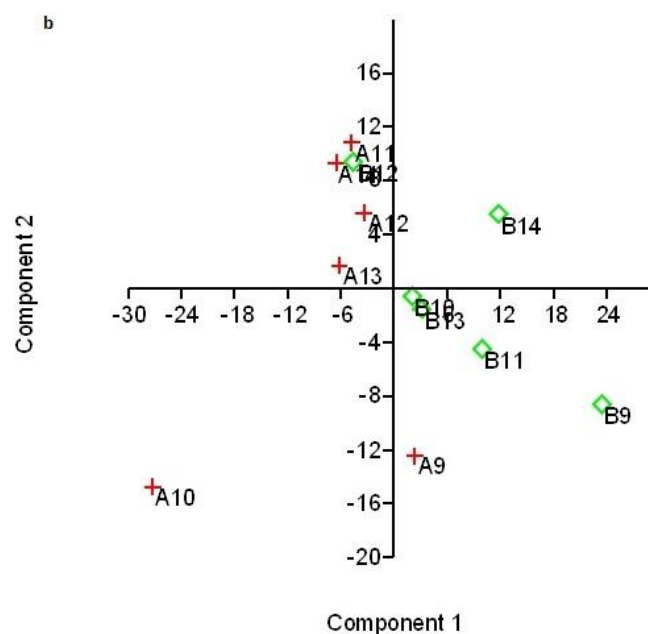


Figura 32. a. Análisis de componentes principales utilizando los T-RFs para muestras 1-8. Donde el componente 1 explica el 27,9% y el componente 2 explica el 21,4%. b. Análisis de componentes principales utilizando los T-RFs para muestras 9-14. Donde el componente 1 explica el 38,4% y el componente 2 explica el 18,9%. A1, A2, A3,... representan las sucesivas muestras del reactor A, lo mismo para B que representa las muestras para el reactor B.

Índices de diversidad

Basados en los perfiles de T-RFLP de Bacteria se determinó los índices de diversidad utilizando el programa PAST (**Tabla 7**). Se observan valores similares para las comunidades de ambos reactores en el año de muestreo. Para el reactor A, el índice de Simpson varió entre 0,82-0,94 y el índice de Shannon varió entre 1,97-2,90 mientras que para el reactor B el índice de Simpson varió entre 0,79-0,95, mientras que el índice de Shannon estuvo entre 1,79-3,01. Si comparamos el periodo I con el II para el reactor A no hubo grandes diferencias en el índice de Simpson, en el I los valores estuvieron entre 0,85 y 0,93 y en el II entre 0,82 y 0,94, mientras que para el índice de Shannon estuvo en el periodo I entre 2,11 y 2,77 mientras que en el II estuvo entre 1,97 y 2,90. Lo mismo sucedió para el reactor B, los valores en el periodo I para el Índice de

Simpson estuvieron entre 0,86 y 0,95 y en el II entre 0,79 y 0,93 mientras que para el índice de Shannon en el periodo I estuvo entre 2,20 y 2,64, y en el periodo II entre 1,79 y 2,77.

En general, estos valores fueron mayores que los obtenidos para la comunidad de arqueas (**Tabla 6**).

Tabla 7. Índices de diversidad obtenidos a partir de los perfiles de T-RFLP de Bacteria para las muestras del reactor A (**a**) y para las muestras del reactor B (**b**).

Índices de diversidad	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
Simpson_1-D	0,93	0,90	0,90	0,93	0,93	0,89	0,90	0,85	0,82	0,84	0,90	0,92	0,91	0,94
Shannon_H	2,66	2,48	2,44	2,75	2,77	2,48	2,45	2,11	1,99	1,97	2,38	2,67	2,52	2,90

Índices de diversidad	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14
Simpson_1-D	0,87	0,90	0,95	0,87	0,87	0,88	0,86	0,92	0,79	0,92	0,86	0,93	0,91	0,87
Shannon_H	2,20	2,52	3,01	2,30	2,26	2,46	2,30	2,64	1,79	2,61	2,20	2,77	2,52	2,27

Determinación de los parámetros Ri, Dy, y Co para describir la estructura de la comunidad de bacteria a partir de los perfiles de T-RFLP

Riqueza de la comunidad

En la **Figura 33**, se observa los valores calculados de riqueza de la comunidad de Bacteria para las muestras de ambos reactores. Se observa que para ambos reactores el número de T-RFs disminuye en la muestra 9, tomada luego del receso de la fábrica.

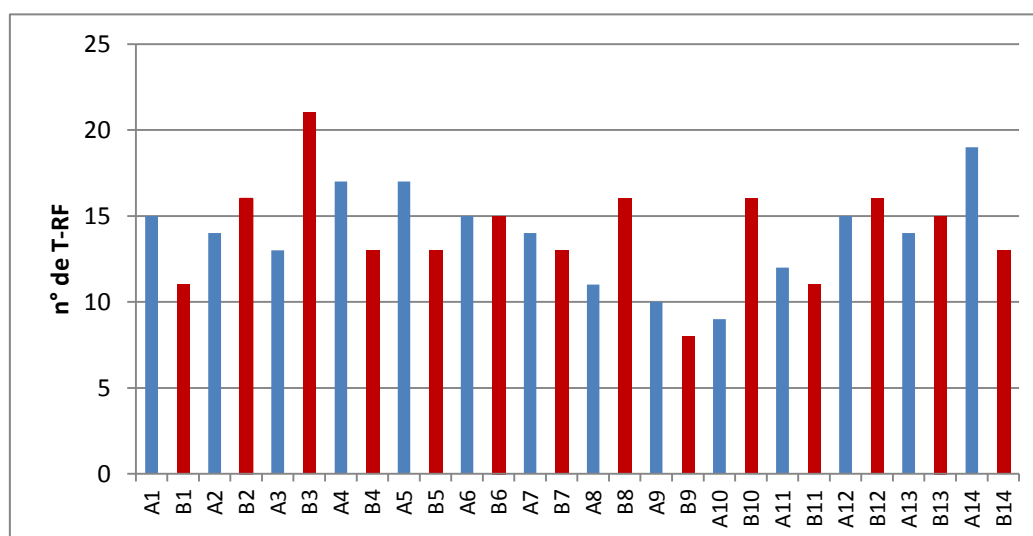


Figura 33. Número de picos de T-RF por muestra. Comparación de muestras entre reactores.

Dinámica de la comunidad

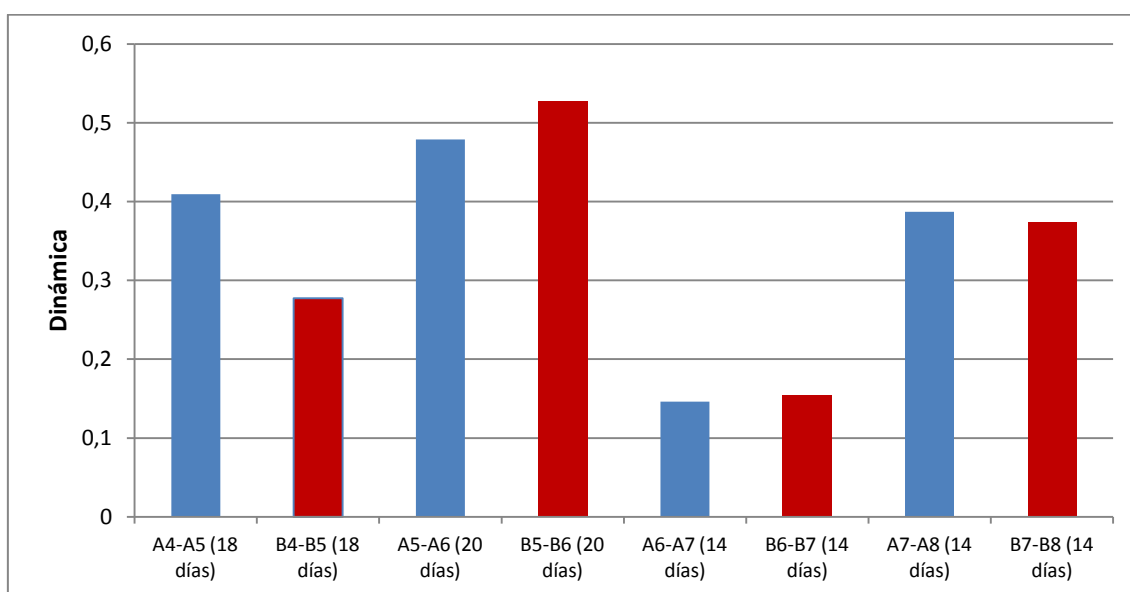


Figura 34. Gráfico de dinámica vs período de tiempo entre muestras, comparación entre reactores en el periodo I.

En el reactor A en el periodo I (muestras A1- A8), la dinámica varió en el rango de 14,5-48%, mientras que para el reactor B en el periodo I varía 15-52%. El análisis entre reactores muestra que la dinámica en el tiempo fue similar en este período con una gran variación.

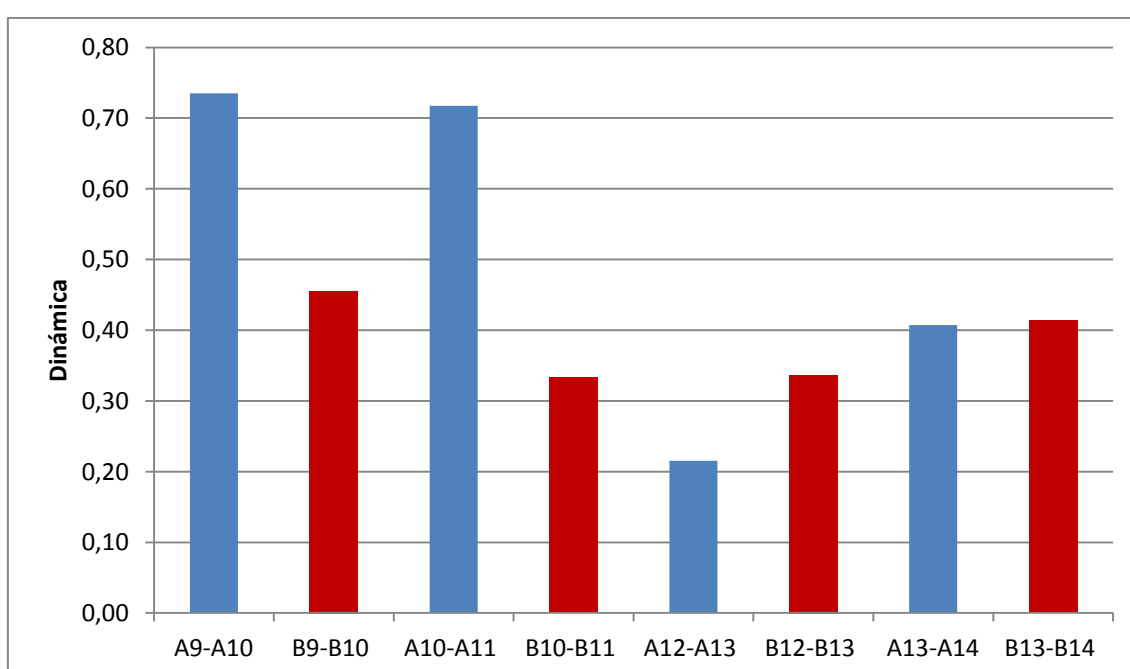


Figura 35. Gráfico de dinámica vs período de tiempo (cada 14 días) entre muestras.

En el reactor A en el periodo II (muestras A9- A14), la dinámica presentó valores en el rango de 22-73%, mientras que para el reactor B en el periodo II varía 33-46%. El análisis entre reactores muestra que la diferencia en dinámica entre reactores fue mayor en este período en comparación al primero. En particular luego del agregado de preparado comercial se observó una alta dinámica de la comunidad en el reactor A.

Organización de la comunidad

Se determinó el coeficiente de Gini como un parámetro para medir la equitatividad de la población. Se observó que para periodo I el coeficiente de Gini del reactor A varió entre 0,26-0,63, mientras que para el reactor B varió entre 0,17-0,69 (**Figura 36**).

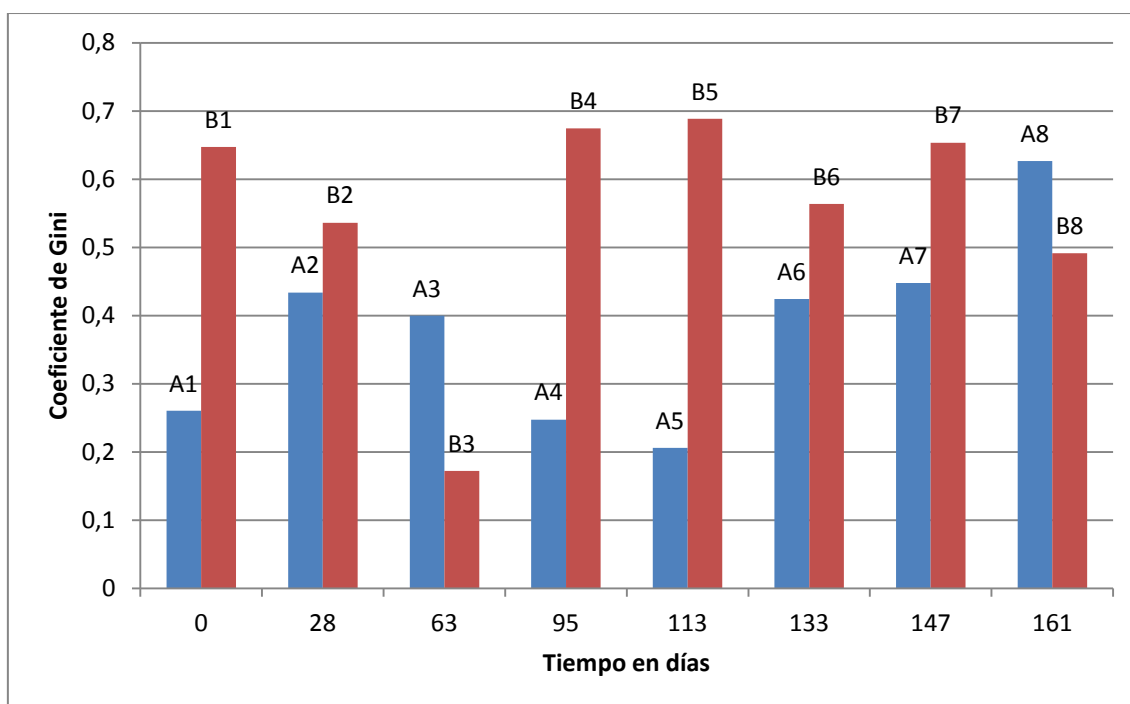


Figura 36. Coeficiente de Gini de la comunidad de bacteria de los reactores A y B durante el período I (muestras 1-8).

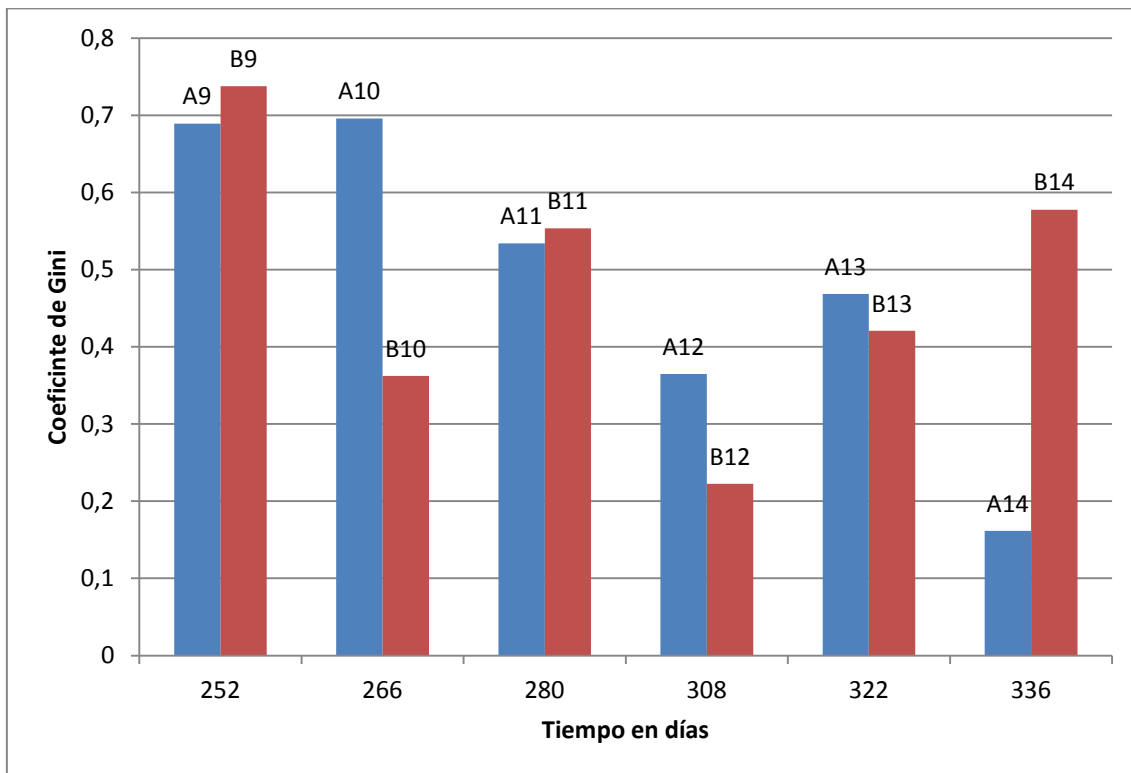


Figura 37. Coeficiente de Gini de de la comunidad de Bacteria los reactores A y B durante el período II (muestras 9-14).

Para las poblaciones de bacterias desarrolladas durante el período II se observaron valores entre 0,16-0,69 para el reactor A y 0,22-0,74 para el reactor B. Se observó un marcado incremento de la desigualdad (índice de Gini mayor) luego del agregado de preparado comercial (muestra A10), no observándose lo mismo para la comunidad del reactor sin agregado (muestra B10) (**Figura 37**).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los reactores se monitorearon durante un año, durante los primeros 6 meses los reactores A y B se operaron en condiciones similares conectados en paralelo, a partir de febrero del 2011 se agregó al reactor A un preparado comercial B120 de la empresa BIO-SYSTEMS (www.BIOBUGS.com). Según los fabricantes, el preparado contiene una gama especialmente formulada de microorganismos de alto rendimiento adaptados y desarrollados para su uso en el tratamiento biológico de aguas residuales de grasas y aceites en digestores anaerobios. Además contiene depresores de tensión superficial que sueltan y licuan los depósitos de grasa pesada, ayudando así a su biodegradación. La dosis fue calculada según las especificaciones del fabricante. Si se compara la cantidad de biomasa del preparado comercial agregada con respecto al total de biomasa del reactor (expresada como sólidos suspendidos volátiles) el agregado representa un 0,55% de la biomasa del reactor considerando todo lo agregado durante los 6 meses del tratamiento.

La proporción utilizada en nuestro trabajo es considerablemente menor a las proporciones utilizadas en otros trabajos, por ejemplo, en el trabajo reportado por Cirne [15] la cantidad de biomasa de la cepa lipolítica utilizada correspondió al 1,3% del VS del inóculo metanogénico añadido. Por lo tanto es probable que la dosis de microorganismos sea muy pequeña como para tener un efecto importante en la población, sobre todo teniendo en cuenta que para que la biomasa sea retenida en el reactor se debe además adherir a los gránulos.

EFFECTO DEL AGREGADO COMERCIAL SOBRE LA OPERACIÓN DE LOS REACTORES

Los técnicos de la empresa realizaron el monitoreo diario de pH, DQO del influente y efluente, producción de biogás y remoción de grasas y aceites. Analizando estos datos

se observó que los reactores mantuvieron un pH similar entre ellos tanto en el periodo I como en el II. Los valores de pH de los reactores variaron entre 5,6-7,6 no mostrando diferencias significativas entre ellos ni en el periodo I ni en el II, por lo tanto el pH no se vio afectado por el agregado de preparado comercial.

Ambos reactores se acidificaron en dos puntos que correspondieron a los períodos de las fechas del 11 al 23-07-2011 (muestras A3 y B3) llegando a un pH de 5,84, y del 26 al 31-12-2011 llegando a un pH de 5,6. Estas disminuciones del pH se correspondieron con la acidificación del influente probablemente causada por algún cambio en la producción. A pesar de estos descensos puntuales los reactores recuperaron muy rápidamente su capacidad de producir metano luego de ajustado el pH del influente.

Para la remoción de **DQO y producción de biogás**, no se observó diferencia significativa entre los valores obtenidos para los reactores A y B ni antes ni después del agregado del preparado hidrolítico. El promedio de remoción de DQO para el reactor A en el año de muestreo osciló entre 76 y 90%, mientras que para el reactor B estuvo entre 73 y 88%. Sin embargo se ve una tendencia al incremento de remoción de DQO en los dos reactores luego del período de no operación, lo que podría indicar que sería favorable para este proceso el receso en el funcionamiento de ambos reactores. También podría deberse a un efecto estacional.

Los valores obtenidos en el proceso son similares a los reportados para algunos trabajos de tratamiento de aguas residuales que contienen lípidos y LCFA en reactores anaerobios UASB (**Tabla 8**) [65].

Tabla 8. Tratamiento de aguas residuales que contienen lípidos y LCFA en diferentes reactores anaerobios. **Adaptado de Sousa et. al 2007 [65].**

Tipo de agua Residual	Tipo de Reactor	Escala	Remoción de DQO (%)	Referencia
Mezcla de LCFA	UASB	Laboratorio	82–93	Hwu et al. (1998)
Mezcla de LCFA (glucosa)	CSTR + UASB	Real	60–95	Kim et al. (2004)
Fabrica de helados	UASB	Laboratorio	49	Hawkes et al. (1995)
Indutrias de alimentos	UASB	Real	84–98	Jeganathan et al. (2006)
Matadero	UASB	Real	60–93	Torkian et al. (2003)
Fabrica de aceite de girasol	UASB	Real	87	Saatci et al. (2003)
COLEME	UASB	Real	90	Passegi et al. (2009)

El único parámetro de operación monitoreado que se afectó sensiblemente con el agregado fue la remoción para **grasas y aceites**. Se observó un aumento del 43% de la remoción de grasas y aceites para el reactor A después del agregado del preparado hidrolítico con respecto al reactor B, a pesar de que los datos presentaron una gran desviación estándar.

El hecho de que aumente la degradación de grasas y aceites y no se observe variaciones en la remoción de DQO ni en la producción de metano sugiere que el preparado comercial está actuando solamente en la primera etapa de la cadena de degradación anaeróbica no afectando los pasos siguientes. Por lo tanto, la materia grasa hidrolizada debería resultar en una acumulación de intermediarios que no se degradan totalmente como son los ácidos grasos de cadena larga y el glicerol. Si el paso limitante es la degradación de ácidos grasos de cadena larga, se debería entonces detectar una acumulación de éstos.

Los trabajos de Cirne y colaboradores [15], mostraron que, cuando el proceso de bioaumento con un microorganismo específico es positivo, aumenta la producción de metano y/o aumenta el ritmo de producción de metano [15]. El aumento en la producción de metano resulta de un incremento de la bio-disponibilidad de sustrato mientras que un aumento en la velocidad de producción de metano es consecuencia de una conversión más rápida de él o los sustrato(s) involucrados en el paso limitante de la conversión. El principal efecto observado en nuestro trabajo fue que mejoró la hidrólisis de las grasas, ayudando entonces a reducir la duración de la etapa hidrolítica. El

principal inconveniente de esta reducción puede ser la acumulación de LCFAs, que, en determinadas concentraciones, pueden inhibir la metanogénesis [15]. Esta inhibición no fue detectada en nuestro trabajo ya que no se vio afectada la producción de biogás.

En el trabajo presentado por Passeggi y colaboradores [46] se realizaron ensayos de inhibición con diferentes relaciones de ácidos grasos de cadena larga y biomasa determinada como sólidos suspendidos volátiles (VSS). En la **Figura 38** se observa cómo evolucionó la biomasa de los reactores durante el arranque y en la **Figura 39** se observan los resultados de los ensayos de inhibición de la metanogénesis por palmitato de sodio (componente más abundante de los triglicéridos de la leche). Las mediciones se realizaron con una concentración variable de la biomasa (expresado como VSS) y palmitato, mientras que la concentración de acetato se mantuvo constante.

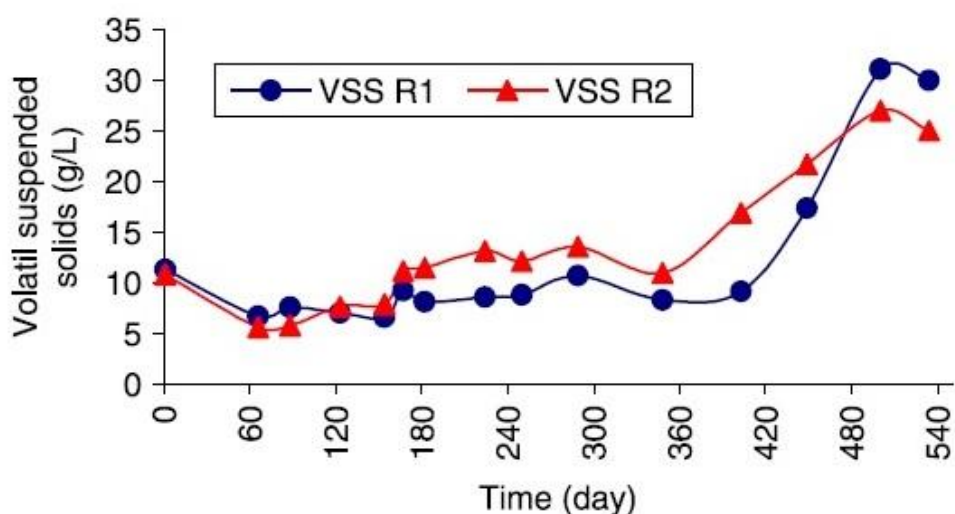


Figura 38. Se muestra la evolución de VSS. Contenido de sólidos volátiles suspendidos en los reactores a lo largo del tiempo.

De acuerdo a estos ensayos de inhibición de la LCFA se encontró que la actividad metanogénica específica disminuyó con el aumento de la concentración de palmitato y

con el aumento de la relación de palmitato/VSS (Figura 40).

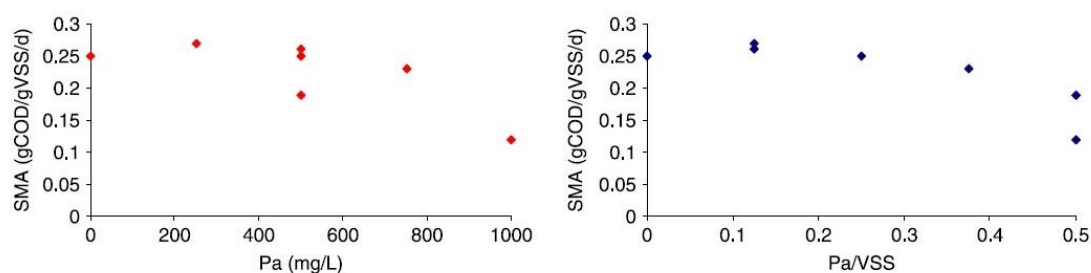


Figura 39. Efecto de inhibición del Palmitato (Pa) sobre la actividad metanogénica específica [46].

En la Figura 39 se observa que la actividad metanogénica disminuye, es decir, hay inhibición, cuando la concentración de palmitato supera los 600 mg/L [46].

A partir de los datos de remoción de grasas y aceites suministrados por la empresa, se realizaron cálculos aproximados para conocer la cantidad de palmitato presente en los reactores luego del agregado del preparado hidrolítico. Para realizar estos cálculos se supuso que toda la grasa del efluente está compuesta por triglicéridos de palmitato ya que los datos de composición de la leche indican que el 98% de esta está compuesta por triglicéridos en su mayoría de palmitato. Se calculó el promedio de grasa removida en mg/L para el reactor A en el periodo I y en el periodo II restando la cantidad de grasas y aceites de entrada al reactor menos la de salida, estos datos fueron de 162mg/L y de 411mg/L respectivamente.

Se calculó si la cantidad de palmitato que se libera está por debajo o por encima del nivel de inhibición antes y después del agregado del preparado hidrolítico. se procedió de la siguiente manera:

Considerando que el peso molecular del triglicérido de palmitato (TGP) es 807 g/mol, en el caso del promedio de remoción de grasa en el periodo I si se divide 162mg/L de grasa entre el peso molecular del triglicérido obtenemos que se liberarían un total de

0,20 milimoles de TGP. Según la estequiometria, por cada mol de TGP se liberarían 3 moles de palmitato, por lo tanto se liberan 0,6 milimoles/L de palmitato. Multiplicando este valor por el PM del palmitato que es 256g/mol, tenemos un total de 154mg/L de palmitato, que es inferior a la concentración mínima inhibitoria.

De igual manera se calculó la concentración de palmitato luego del agregado del preparado hidrolítico, con un peso molecular de 807g/mol y una remoción promedio de grasa de 411mg/L. Se liberan un total de 0,51 milimoles de TGP, entonces por cada mol de TGP se liberaría 3 moles de palmitato, por lo tanto se liberan 1,5 milimoles/L de palmitato. Multiplicando esto por el PM del palmitato tenemos un total de 391mg/L, que es inferior a la concentración mínima inhibitoria.

Estos resultados sugieren que no hubo inhibición de la metanogénesis debido a que la cantidad de ácidos grasos de cadena larga liberados durante al degradación de lípidos fue inferior a la concentración inhibitoria.

EFFECTO DEL AGREGADO DE PREPARADO COMERCIAL SOBRE LA COMUNIDAD DE BACTERIA

Los resultados del monitoreo de la comunidad de Bacteria muestran que la comunidad fue muy similar para ambos reactores durante el periodo I ya que se vio un agrupamiento de muestras entre los reactores A y B para la misma fecha tanto para análisis de cluster como análisis de PCA. Mientras que para el periodo II se observó un agrupamiento de muestras por reactor y no por fecha. Esto indica una diferenciación en las comunidades bacterianas entre reactores los reactores A y B luego del agregado del preparado hidrolítico en el reactor A. El efecto fue sin embargo tenue y se va perdiendo con el tiempo ya que las muestras de los dos reactores se vuelven a agrupar. Por otra parte, la gran variabilidad en las comunidades de los reactores podría impedir que el efecto se observe plenamente.

A los efectos de determinar si el agregado de preparado comercial al reactor A produce algún efecto en cómo se estructura la comunidad bacteriana, se calcularon los parámetros descritos por Wittebolle [77] (Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad) a partir de los perfiles de T-RFLP.

Parámetros Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad para Bacteria

Riqueza de la comunidad de Bacteria

Según los resultados para el reactor A en el periodo I la comunidad bacteriana la riqueza varió entre 11 y 17 T-RFs por muestra (promedio de **15**), y en el periodo II de muestreo, varió entre 9 y 19 picos (promedio de **13**). Para el reactor B, fluctuaron entre 11 y 21 T-RFs por muestra (promedio de **15**) en el periodo I, y entre 8 y 16 (con una media de **13**) en el periodo II. Lo que representó una disminución de la media de picos para ambos reactores en el periodo II, no se observaron diferencias en la riqueza entre los reactores debidas al agregado del preparado de microorganismos hidrolíticos al reactor A.

Los valores de riqueza obtenidos son similares a los valores obtenidos con otros trabajos también realizados con reactores de escala real metanogénicos [53] (**Tabla 9**). Estos autores observaron también una gran variación en este parámetro a lo largo de la operación.

Tabla 9: Tabla comparativa de Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad para el dominio Bacteria de distintos reactores anaerobios mesófilos.

		BACTERIA					
				Industria láctea en estudio			
		Pycke et al. 2010	Carballa et al. 2011	A		B	
				I	II	I	II
Riqueza	Media	8	17	15	13	15	13
	Máx	18	22	17	19	21	16
	Min	2	12	11	9	11	8
Dinámica		0.20-0.40	0.48-0.61	0.14- 0.47	0.22- 0.73	0.15- 0.53	0.33- 0.45
Org. de la comunidad.		0.39	0.28-0.51	0.20-0.63	0.16-0.68	0.17-0.69	0.22- 0.73

Dinámica de la comunidad de Bacteria

Los valores de dinámica fueron calculados para ambos reactores cada 14 días. Las muestras del reactor A tomadas durante el período I (muestras 1-8) tuvieron un rango de variación entre 15-**60%** y luego del agregado del preparado hidrolítico (muestras 9-14) el rango de variación fue 22-**73%** (período II). Para ambos periodos la dinámica fue alta, y además se observó un aumento en la dinámica de la comunidad para el reactor A luego del agregado del preparado comercial. Este aumento de la dinámica refleja el cambio ocurrido en la comunidad sobre todo durante el comienzo del agregado del preparado.

Si bien en el reactor B el rango de variación fue similar durante el período I (para las muestras de 1-8 de 15-**63%** cada 14 días) esta dinámica no se vio incrementada durante el período II (para las muestras 9-14 fue de 33-**46%** cada 14 días), sino que para este reactor se observó una disminución de la dinámica en el periodo II de muestro.

Varios trabajos han reportado una alta dinámica en bioreactores anaerobios [12], estudiando reactores metanogénicos escala laboratorio, encontraron una alta dinámica tanto para el dominio Bacteria como para Archaea, el rango de variación estuvo entre 30% y 75% cada 18 días aunque se estuviese en periodos estables de funcionamiento de los reactores. En el trabajo de [53] y colaboradores (referencia), estudiando reactores metanogénicos escala real de tratamiento de diferentes aguas residuales tanto industriales como de lodos de tratamiento de efluentes domésticos, reportaron que las comunidades fueron muy dinámicas y variadas tanto para las bacterias y arqueas, con tasas de cambio entre 20-40% y 18-44% respectivamente, en períodos de 15 días.

Esta alta dinámica ha sido reportada como una característica de bioreactores metanogénicos con buen funcionamiento. Esto supone una convergencia en el metabolismo de los distintos grupos, lo que hace que no se vea afectada la funcionalidad

del sistema a pesar de la variación de la dinámica. La digestión anaeróbica no implica un solo tipo de cadena trófica, sino que representa una multitud de bioconversiones convergentes, esto junto con la disparidad en las tasas de crecimiento afectan significativamente a la dinámica de la comunidad [64]. Por otra parte, estas características de una alta dinámica de la comunidad son presumiblemente debido al gran potencial metabólico en las comunidades anaeróbicas en digestores [29]. Una amplia gama de metabolitos (ácidos grasos, alcoholes, aminos, etc), tienen una vía específica para ser convertidos en los dos productos finales principales, como CH_4 y CO_2 . En tal situación, de una canalización de bioconversiones, es concebible que constantemente todas las rutas estén experimentando dificultades, por ejemplo, metabolitos críticos de una conversión influyen en la cinética de otra conversión. En este contexto, múltiples rutas hacia un embudo común resulta en la no existencia de un grupo dominante y estable de los organismos que gobiernan el proceso global. En realidad, bajo condiciones donde hay productos que no deberían acumularse, puede ser muy crítico que con el tiempo cada grupo microbiano responsable pueda entrar en dominancia. Por lo tanto, los altos valores de dinámica, pueden ser características de un buen funcionamiento del sistema de digestión anaerobia, en el cual todos los procesos y su correspondiente cruzamiento de cadenas tróficas microbianas, entren en acción apropiadamente [53].

Por el contrario, comunidades con bajos valores de dinámica, es decir, estables, representan un pequeño reservorios que limita la entrada de nuevos microorganismos, esto podría ser útil en términos de rendimiento técnico, pero peligroso en términos de la capacidad de adaptación general [72]. La alta dinámica durante períodos de buen funcionamiento pueden ser explicados por esta redundancia funcional entre los diversos grupos filogenéticos permitiendo oscilaciones de sus poblaciones sin efectos sobre la función del reactor [83, 9]. Las transiciones entre condiciones de deterioro y estabilidad

del reactor son comúnmente relacionados con cambios significativos en las poblaciones microbianas [9].

Organización de la comunidad de Bacteria

Se evaluó mediante el coeficiente Gini (mayor valor, mayor desigualdad de la comunidad). Las muestras correspondientes al reactor A en el periodo I de operación estuvieron entre 0,21-0,63 con un promedio de **0,38**, mientras que en el periodo II estuvieron entre 0,16- 0,70 con un promedio de **0,49**. Esto indica que la comunidad microbiana en el reactor A para el periodo II fue más desigual.

Para el reactor B en el período I, los valores estuvieron entre 0,17 y 0,69 con un promedio de **0,55** y en el periodo II estuvieron entre 0,74 y 0,36 con un promedio de **0,48**. Según estos resultados la comunidad bacteriana para B fue menos desigual en el periodo II.

En otros trabajos [12], se reportaron valores de organización de la comunidad entre 0,28-0,51 para bacteria. Mientras que, en el trabajo de Pycke [53], reportan valores promedio de 0,39 para comunidades bacterianas de reactores metanogénicos escala real. De acuerdo con estos valores de organización de la comunidad, el reactor A cae dentro de lo esperado, siendo el reactor B un poco más desigual en la organización de la comunidad en el primer periodo de muestreo.

Estos valores representan comunidades donde las especies más adaptadas son dominantes y están presentes en números altos, mientras que la mayoría está presente en cantidades más bajas. Debido a la elevada concentración de algunas especies y la disponibilidad de muchas otras, la comunidad puede potencialmente hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes y conservar su funcionalidad. Por lo tanto, puede ser visto como una comunidad equilibrada [34].

ESTUDIO DE LA COMUNIDAD DE ARCHAEA

En este trabajo no fue posible determinar los efectos del agregado del preparado hidrolítico sobre la comunidad de Archaea ya que solamente se logró amplificar el gen del ARNr 16S de Archaea en las primeras 5 muestras. No se encontraron razones metodológicas para estos resultados negativos. Una posible explicación sería que la cantidad de arqueas pudo verse sensiblemente disminuida debido a la purga de ambos reactores en la fecha correspondiente a la muestra A5 y B5. En la semana de la fecha 11 al 23-07-2011 se observó una acidificación de ambos reactores, que correspondería a las muestras A3 y B3, esto también pudo haber provocado la disminución de la abundancia de arqueas y la consecuente no detección de éstas. Para aumentar la sensibilidad del método se utilizó la técnica de Nested PCR, pero tampoco se obtuvieron resultados positivos. Por lo tanto solamente se analizaron las muestras durante el primer período de operación, por lo cual no fue posible determinar si el agregado de preparado comercial afectó o no a esta población.

Los resultados obtenidos de T-RFLP del gen ARNr 16S para arqueas muestra que las comunidades fueron similares entre los reactores A y B para la misma fecha de muestreo en ambos análisis realizados, el análisis de agrupamiento (Cluster) y de componentes principales (PCA).

Índices de diversidad para la comunidad de Archaea

Para el reactor A, el índice de Simpson varió entre 0,81-**0,90**. Lo que indica que la comunidad fue poco diversa debido a que el índice fue cercano a 1. El índice de Shannon varió entre 1,84-**2,40**, por lo tanto la comunidad fue poco diversa (valores mayores a 3 indican representan comunidades diversas). Para el reactor B, el índice de Simpson varió entre 0,79-0,85, mientras que el índice de Shannon 1,78-**2,06**, ambos

valores indican una baja diversidad. Para el índice de Shannon el reactor A fue más diverso que el B.

Si se comparan los índices de diversidad para las primeras 5 muestras pero en los análisis del dominio de bacteria, se observa que la mayor diferencia se vio para el índice de Shannon, donde fue mayor para el dominio bacteria en las muestras de ambos reactores. Indicando una mayor diversidad de organismos de Bacteria que de Archaea.

Parámetros Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad para Archaea

A pesar de que no se pudo estudiar la comunidad de Archaea en todas las muestras por los problemas con el PCR ya discutidos, igual se decidió calcular los parámetros Ri, Dy, y Co para la comunidad de Archaea con los datos del primer período para evaluar si los valores están dentro de los reportados por otros trabajos.

Riqueza de la comunidad de arqueas

Según los resultados para el reactor A, la comunidad de Archaea fluctuó entre 8 y 15 picos de T-RF por muestra (promedio de **11**), mientras que para el reactor B fluctuaron entre 8 y 10 picos de T-RF por muestra (promedio de **9**). Si se comparan estas muestras con las primeras 5 muestras de ambos reactores para el análisis de dominio Bacteria, encontramos que para el reactor A se encontraron entre 13 y 17 picos por muestra (promedio de **15**), y para el reactor B entre 11 y 21 picos (promedio de **15**). Esto indica que la comunidad de bacteria tiene una riqueza mayor que la de arqueas. Esto parece lógico ya que el primer grupo se refiere a una multitud de sustratos, mientras que el segundo grupo se limita a nichos estrechos de producción de metano a partir de acetato e hidrógeno. Como ya fuera reportado en trabajos previos **[12]**, la comunidad de Bacteria tiene mayor riqueza que la comunidad de Archaea tanto para reactores mesófilos como termófilos.

En otros trabajos [53], se reportó que la riqueza de la comunidad de arqueas en dos reactores anaerobios mesófilos varió entre 5 y 14 picos por muestra (promedio de 7) mientras que para el caso de otros dos reactores termófilos vario entre 2 y 10 picos por muestra (promedio de 5). Esto mostró una mayor riqueza en comparación con trabajos reportados previamente a escala de laboratorio [74]. A su vez en el trabajo de Pycke [53], se observó que la comunidad en los reactores mesófilos fue más rica que en reactores termófilos.

Tabla 10: Tabla de comparación de los parámetros de Riqueza, Dinámica y Organización de la comunidad para el dominio Archaea de distintos reactores anaerobios.

		ARCHAEA			
		Pycke et al. 2010		Carballa et al. 2011	
		Mesóf.	Termóf.	Mesóf.	Termóf.
				A	B
				I	I
Riqueza	Media	7	5	11	10
	Máx	14	10	15	10
	Min	5	2	8	8
Dinámica	Media			0,36	0,33
	Máx	0,18-0,44		0,48	0,53
	Min			0,15	0,15
Org. de la comunidad	Media			0,38	0,55
	Máx	0,32		0,21	0,69
	Min			0,63	0,17

Dinámica de la comunidad de arqueas

La dinámica para las muestras del reactor A analizadas (1-5) presentaron valores en un rango de variación entre 3-100% cada 30 días, mientras que para el reactor B para las muestras B1-B2, fue 46% cada 30 días. Se obtuvieron muy pocos datos debido a los problemas de la reacción de PCR, por lo tanto no fue posible comparar estos datos con los correspondientes al dominio Bacteria. En otros trabajos [53] se reportó que tanto las comunidades de bacterias como arqueas fueron muy dinámicas y variadas con tasas de cambio entre 20-40% y entre 18-44% respectivamente, cada 15 días. En la mayoría de

los casos se obtuvo que la dinámica fue menor para el dominio de Arqueas que para el de Bacterias.

Organización de la comunidad de arqueas

Se observó que para el reactor A el coeficiente de Gini varió entre 0,37-0,70 con un promedio de **0,56**, mientras que para el reactor B varió entre 0,39-0,58 con un promedio de **0,49**. Lo que indica que la comunidad de Archaea fue más desigual en el reactor A que en el B. En otros trabajos [41], se reportó un coeficiente de Gini en promedio de **0,32** para la comunidad de Arqueas. Además reportan que la organización de Archaea en reactores mesófilos es más desigual (valores de Gini más altos) comparada con reactores termófilos.

Si se compara la organización de la comunidad para las muestras de Archaea con respecto a las primeras 5 muestras de Bacteria (periodo I), encontramos que en el reactor A para bacteria el rango vario entre 0,43 y 0,21 con un promedio de **0,31**. Lo que indica que la comunidad de Archaea es más desigual que la de Bacteria en el reactor A. Mientras que en el reactor B mostró lo contrario, los valores de organización estuvieron entre 0,17 y 0,69, con un promedio de **0,54** para Bacteria; indicando que la comunidad de Bacteria fue más desigual que la de Archaea.

En otros trabajos [12], mediante la técnica de T-RFLP los valores de organización obtenidos estuvieron entre 0,28 y 0,51 para bacteria y entre 0,42 y 0,62 para Archaea. Indicando que la comunidad de Archaea fue más desigual que la de Bacteria. Mientras que, en el trabajo de Pycke [53], reportan que en general, las comunidades bacterianas tienden a tener un mayor valor promedio de Co (0,39), lo que indica mayor desigualdad, que las comunidades arqueas (con un valor promedio Co de 0,32).

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que el agregado de preparado comercial no afectó la remoción de DQO ni producción de biogás, pero sí tuvo un efecto al aumentar la hidrólisis de grasas y aceites. Esto sugiere que la etapa limitante del proceso no fue la hidrólisis sino que es una etapa posterior. Por lo tanto para mejorar el proceso global será necesario aplicar otra estrategia que permita acelerar la etapa limitante. En este sentido volver al régimen de alimentación intermitente podría ser una alternativa exitosa y de bajo costo de implementación.

El aumento de la hidrólisis de grasas y aceites y el no incremento de la metanogénesis significa que debe haber acumulación de algún intermediario que hace que no se degrade totalmente la materia orgánica a metano. Sin embargo, no se detectó inhibición de la metanogénesis por acumulación de ácidos grasos de cadena larga. Esto indica o que la concentración de LCFA no llegó a la concentración necesaria para la inhibición o que el lodo tiene una mayor tolerancia a estos ácidos. Estimaciones basadas en los datos de remoción de grasas sugieren que no se llegó a la concentración inhibitoria reportada previamente. El análisis químico de los ácidos grasos de cadena larga en el efluente podría ayudar a entender este efecto y determinar si realmente la etapa limitante es la degradación de LCFA.

El agregado de preparado comercial afectó la comunidad de Bacteria aunque este efecto se fue perdiendo con el tiempo y las comunidades de los reactores tendieron a igualarse. Los tres parámetros calculados para describir las comunidades de bacteria y arqueas mostraron que las comunidades son muy dinámicas, diversas y que presentan una organización de la comunidad intermedia con algunos dominantes y varios organismos con menor dominancia. Esta estructura es la típica descrita por otros autores que estudiaron comunidades bacterianas de reactores metanogénicos. A pesar de la gran

variación que presentaron estos tres parámetros se observó que luego del agregado la comunidad de bacteria se volvió más dinámica y más desigual, lo que indica que las comunidades de los reactores tienen cierta organización que cambia cuando hay una perturbación pero que vuelve a su estado original cuando hay una adaptación a estos cambios. Estos parámetros son útiles para detectar perturbaciones o mal funcionamiento de los reactores metanogénicos.

Asimismo, en ambos reactores se observó una gran capacidad de recuperación a pesar del descenso del pH en un momento dado, esto sugiere que la estructura de la comunidad permite una rápida respuesta frente a perturbaciones, esta respuesta hace que los procesos sean robustos y soporten las variaciones que habitualmente se presentan en el tratamiento de aguas residuales industriales.

El método de biología molecular utilizado para este trabajo (T-RFLP) dio buenos resultados para la comunidad del dominio Bacteria, siendo menos efectivo para el estudio de la comunidad de Archaea ya que no se logró obtener resultados positivos en el PCR para muchas de las muestras analizadas, a pesar de las variaciones realizadas en los protocolos. No se pudo determinar las causas de estas dificultades por lo cual será necesario realizar más trabajos variando los protocolos tanto de extracción de ADN o de PCR para poder resolver este problema. Al haber detectado metano en estas muestras es esperable que haya arqueas metanogénicas. Aplicar otras técnicas como FISH o PCR en tiempo real pueden ser buenas alternativas para verificar la presencia de arqueas en estas muestras.

Debido a estos problemas no fue posible determinar el efecto del agregado comercial sobre la comunidad de arqueas, sin embargo, se obtuvo información que confirma resultados anteriores de otros autores que muestran que la comunidad de arqueas tiene en general menor riqueza y dinámica que la de bacteria.

En este trabajo se estudió por primera vez el efecto de un agregado comercial en la microbiología de reactores metanogénicos escala real, son necesarios entonces más trabajos para poder confirmar estos resultados.

7. PERSPECTIVAS

Para mejorar el efecto del preparado comercial podría sugerirse aumentar la dosis del agregado ya que en otros trabajos se agrega una mayor cantidad y se logran buenos resultados aumentando en la remoción de DQO y producción de biogás. También sería importante conocer cuáles son los microorganismos que componen este producto comercial para saber si pueden o no mejorar la degradación de ácidos grasos de cadena larga u otros de los intermediarios de la degradación total de lípidos a metano. En este sentido se podría realizar el análisis del preparado comercial utilizando alguna técnica que permita determinar cuáles son los microorganismos se introducen al reactor y evaluar si se mantienen o se lavan con la operación del reactor.

Para poder confirmar que hay acumulación de algún intermediario de la degradación de lípidos es necesario determinar la concentración de ácidos grasos de cadena larga y corta .

Para profundizar más en el tipo de microorganismos que prevalecieron en el reactor podría realizarse el análisis de la composición de la comunidad mediante pirosecuenciación o librería de clones; también se podría cuantificar por la técnica de PCR en tiempo real algún grupo en especial para ver diferencias entre los reactores.

8. ANEXOS

Anexo 6.1. Protocolo de extracción de ADN con el kit UltraClean™ (MoBio Laboratories, inc)

Previo a la extracción de ADN se homogeneizaron las muestras mediante agitación para sacar una alícuota representativa y los gránulos se disgregaron utilizando un mortero estéril.

1. Colocar 1,5 mL de muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugar a 10000g durante 5 minutos.
2. Colocar el pellet en tubos Bead Solution de 2 mL suministrados en el kit.
3. Mezclar en vortex.
4. Agregar 60 µL de la Solución S1 y mezclar en vortex.
5. Agregar 200 µL de la solución de IRS (Inhibitor Removal Solution).
6. Colocar los tubos Bead en posición horizontal sobre un vortex plano y asegurarlos con cinta adhesiva. Mezclar en vortex a máxima velocidad durante 10 minutos.
7. Centrifugar los tubos a 10000g durante 30 segundos.
8. Transferir el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5 mL (dependiendo de la muestra se espera entre 400-450 µL de sobrenadante).
9. Agregar 250 µL de la Solución S2 y mezclar en vortex durante 5 segundos. Incubar a 4°C durante 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos a 10000g durante 1 minuto.
11. Descartar el pellet, transferir sobrenadante a tubos Eppendorf de 2 mL.
12. Agregar 1,3 mL de la Solución S3 al sobrenadante (con cuidado de no desbordar) y mezclar en vortex.
13. Cargar aproximadamente 700 µL en las columnas con filtro y centrifugar a 10000g durante 1 minuto. Descartar el líquido que traspasó la columna, agregar más sobrenadante a la columna y volver a centrifugar a 10000g durante 1 minuto. Repetir hasta pasar todo el sobrenadante a través del filtro de la columna (se requiere un total de 3 veces por muestra).
14. Agregar 300 µL de la Solución S4 y centrifugar a 10000g durante 30 segundos.
15. Descartar el líquido que pasó por la columna.
16. Centrifugar de nuevo durante 1 minuto.
17. Colocar cuidadosamente la columna en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 mL. Evitar trasladar la columna con restos de Solución S4.

18. Agregar 30 μL de agua miliQ en el centro de la membrana del filtro.
19. Centrifugar durante 30 segundos.
20. Descartar la columna, El ADN está listo para su utilización. De lo contrario almacenar a -20°C .

Anexo 6.2. Protocolo de T-RFLP del gen del ARNr 16S para Bacteria

- 1) PCR
- 2) Purificación (PCR purification kit Qiagene)
- 3) Corte con enzimas de restricción
- 4) Precipitación de fragmentos con etanol
- 5) Separación en secuenciador capilar
- 6) Análisis de perfiles

- 1) PCR

Para una reacción de 50 μL (49 μL de master mix y 1 μL de ADN (dilución 1/10).

Reactivos	Volumen (μL)
H ₂ O	31,5
Buffer 10x	5
MgCl ₂ (Invitrogene, 50mM)	3
BSA	0,5
DNTP(2,5mM c/u)	4
27F lab (10 μM)	2
1492 R (10 μM)	2
ADN	1
Taq polimerasa (Invitrogene) (500U/ μL)	1

- 2) Amplificación

Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
Hold 1	94°C	5
Ciclo 30 repeticiones	94°C	1
	55°C	3
	72°C	3
Hold 2	72°C	7
Hold 3	4°C	10

Duración del ciclo de amplificación: 3 horas y 20 minutos aproximadamente.

Correr en gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio para verificar productos de PCR.

3) Juntar 2 productos de PCR (100 µL) y purificar utilizando el PCR purification kit (QIAquick), obteniéndose el ADN concentrado a 30 µL.

4) Corte con enzimas de restricción *MspI* por reacción:

Reactivos	Volumen (µL)
DNA	45
Buffer 10x	4
<i>MspI</i>	1,2
H ₂ O	4,8

Incubar a 37°C toda la noche. Inactivar al día siguiente las enzimas (65°C-10minutos)

5) Purificación de los fragmentos

Los fragmentos obtenidos se precipitan con etanol 95% a 4°C (por 30 minutos), se centrifugan a 17000g a 4°C (30 minutos) y se lava el pellet con 100 µL de etanol 70%, centrifugar a la misma velocidad por 10 minutos y finalmente se secar en estufa a 65°C por 5 minutos.

7) Resuspender los fragmentos precipitados en 8 µL formamida y 0,3 µL de marcador interno (GeneScan -1200 Liz, Applied biosystems), luego se separan por electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems) en el servicio que brinda el Instituto Pasteur de Montevideo.

Condiciones de corrida en Instituto Pasteur

El programa de análisis utilizado es el genemapper, la corrida se realiza con capilares de 36 cm y polímero POP7. La matriz utilizada es la DS-33 (esto depende de los fluorocromos y el marcador que se utilice), la corrida es de 20 minutos, a 15 kV, tiempo de inyección 16 segundos, 180 segundos de precorrida, 60°C temperatura del horno.

6) Los cromatogramas se analizan con el programa Peak Scanner (Applied Biosystem).

Anexo 6.3. Protocolo de T-RFLP del gen del ARNr 16S para Archaea

- 1- PCR
- 2- Purificación (PCR purification kit Qiagene)
- 3- Digestión con enzimas de restricción
- 4- Precipitación de fragmentos con etanol
- 5- Separación en secuenciador capilar
- 6- Análisis de perfiles

1- Reacción de PCR para Arquea

Reactivos	Volumen (µL)
H ₂ O	30,5
Buffer 10X	5
MgCl ₂	3
BSA	0,5
dNTP	5
Primer Reverse 958	2,5
Primer Foward 21	2,5
ADN	1

Taq polimerasa (Invitrogen)	1
--------------------------------	---

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold 1	94°C	5 minutos
Ciclo 30 repeticiones	94°C	45 segundos
	55°C	1 minutos
	72°C	90 segundos
Hold 2	72°C	7 minutos
Hold 3	4°C	10 minutos

Correr en gel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio para verificar productos de PCR.

2) Purificación: Se juntan 2 productos de PCR (100 µL) y se purifica por PCR purification kit (QIAquick), obteniéndose el ADN concentrado a 30 µL.

3) Digestión con enzimas de restricción

Reactivo	Volumen (µL)
DNA	45
Buffer 10X	4
<i>TaqI</i>	1,2
H ₂ O	4,8

Incubar a 65°C por 3 horas.

4- Purificación de los fragmentos

Los fragmentos obtenidos se precipitan con etanol 95% a 4°C (por 30 minutos), se centrifuga a 17000 g a 4°C (30 minutos) y se lava el pellet con 100 µL de etanol 70%, centrifugar a la misma velocidad por 10 min y finalmente se secar en estufa a 65°C por 5 minutos.

Resuspender los fragmentos precipitados en 8 µL formamida y 0.3 µL

Condiciones de separación de los fragmentos en secuenciador automático del Instituto Pasteur de Montevideo

El programa de análisis es el Genemapper (Applied Biosystem), la corrida se realiza con capilares de 36cm y polímero POP7, La matriz utilizada la DS-33 (esto depende de los fluorocromos y el marcador utilizado), la corrida es de 20 minutos, a 15 kV, tiempo de inyección 16 segundos, 180 segundos de precorrida, 60°C temperatura del horno.

Los cromatogramas se analizan con el programa Peak Scanner (Applied Biosystem).

Anexo 6.4. Nested PCR para Archaea

PCR 1 (21F-1392R)

Reactivos	Volumen (µL)
H ₂ O	13,5
Buffer 10X	2,5
dNTP	2,5
Primer Forward 21	0,5
Primer Reverse 1392	1,0
DNA	1,0
Taq polimerasa	0,1

Para una reacción de 25 µL (24 µL de master mix y 1 µL de ADN (dilución 1/10)).

Paso	Temperatura	Tiempo (minutos)
Hold 1	94°C	5
Ciclo 30 repeticiones	94°C	1
	55°C	1
	72°C	3
Hold 2	72°C	7

Hold 3	4°C	10
--------	-----	----

PCR 2 (109F*-938R)

Reactivos	Volumen (µL)
H ₂ O	27
Buffer 10X	5
dNTP	4
Primer Reverse 958	2
Primer Froward 109	1
DNA	1
Taq polimerasa	0,2

Para una reacción de 25 µL (24 µL de master mix y 1 µL de ADN (dilución 1/10)).

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold 1	94°C	5 minutos
Ciclo 30 repeticiones	94°C	30 segundos
	52°C	45 segundos
	72°C	90 segundos
Hold 2	72°C	7 minutos
Hold 3	4°C	10 minutos

Anexo 6.5. Protocolo de purificación de producto de PCR mediante el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)

1. Agregar 5 volúmenes de Buffer PB y 1 volumen de la reacción de amplificación por muestra, mezclar en vortex por 5 segundos.
2. Colocar en las columnas de 2 mL QIAquick spin column.
3. Para unir el ADN, centrifugar las columnas a 17000g por 30-60 segundos.
4. Descartar el filtrado. Colocar el filtro en la misma columna QIAquick y volver a centrifugar.

5. Para lavar, agregar 0,75 mL de Buffer PE en la columna y centrifugar 30-60 segundos.
6. Descartar el filtrado. Colocar el filtro en la misma columna QIAquick y volver a centrifugar por 1 minuto a velocidad máxima.
7. Colocar la columna QIAquick en un Eppendorf de 1,5 mL estéril.
8. Para eluir el ADN, agregar 30 μ L de agua miliQ en el centro de la columna, dejar reposar por un minuto, y centrifugar 1 minuto.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ahring, B.** 2001. Perspectives for Anaerobic Digestion. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **81**: 2-22
2. **Amann, R. and Ludwig, W., Schleifer, K. H.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
3. **Anderson, I., Ulrich, L.E., Lupa, B., Susanti, D. and Porat, I.** 2009. Genomic Characterization of Methanomicrobiales Reveals Three Classes of Methanogens. *PLoS ONE* **4**(6): e5797.
4. **Angelidaki I. and Ahring B.K.** 2000. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Sci Technol* **41**: 189–194.
5. **Angelidaki I., Ellegaard L. and Ahring B. Kioer.** 2003. Applications of the Anaerobic Digestion Process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*,. **82**: 2-29.
6. **Ariesyady, H. D., Ito, T. and Okabe, S.** 2007. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res.* **41**:1554-68.
7. **Bapteste, É., Brochier, C. and Boucher, Y.** 2005. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archea* **1**, 353–363
8. **Bell T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L. and Lilley A.K.** 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**: 1157-1160
9. **Briones, A. and Raskin, L.** 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in engineered environments and their implications for process stability. *Curr Opin Biotechnol* **14**:270–276

10. **Caldera, Y., Madueño, P., Griborio, A., Fernandez, N. and Gutiérrez, E.** 2005. Effect of the organic load in the performance the UASB reactor treating slaughterhouse effluent
11. **Cammarota, MC., Teixeira, G.A. and Freire, D.M.G.** 2001. Enzymatic pre-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with high fat contents. *Biotechnol Lett* **23**:1591–1595.
12. **Carballa, M., Smits, M., Etchebehere, C., Boon, N. and Verstraete, W.** 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 303–314
13. **Cavaleiro, A.J., Pereira, M.A. and Alves, M.** 2008. Enhancement of methane production from long chain fatty acid based effluents. *Bioresource Technology* **99**: 4086–4095
14. **Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., and Sghir, A.** 2005. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. *Environmental Microbiology* **7**: 1104–1115
15. **Cirne, D.G., Björnsson, L., Alves, M., and Mattiasson B.** 2006. Effects of bioaugmentation by an anaerobic lipolytic bacterium on anaerobic digestion of lipid-rich waste. *J Chem Technol Biotechnol* **81**:1745–1752
16. **Cirne, D.G., Paloumet, X., Björnsson L., Alves, M.M. and Mattiasson, B.** 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste—Effects of lipid concentration. *Renewable Energy* **32**: 965–975
17. **Collins, G., Woods A., McHugh S., Carton M.W. and O’Flaherty V.** 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbial Ecology* **46**: 159-170
18. **Collins, G., Kavanagh, S., McHugh, S., Connaughton, S., Kearney, A., Rice, O., Carrig, O., Scully, C., Bhreathnach, N., Mahony, T., Madden, P., Enright, A. M. and Flaherty V. O.** 2006. Accessing the black box of microbial diversity and ecophysiology: recent advances through polyphasic experiments. *J. Environ. Sci. Health., A* **41**:897–922.
19. **Etchebehere, C., Pavan, M. E., Zorzópulos, J., Soubes, M. and Muxi, L.** 1998. *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic

- bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1297-1304.
20. **Fernandez, A.S., Hashsham, S.A., Dollhopf, S.L., Raskin, L., Glagoleva, O., Dazzo, F.B., Hickey, R.F., Criddle, C.S. and Tiedje, J.M.** 2000. Flexible community structure correlates with stable community function in methanogenic bioreactor communities perturbed by glucose. *Appl. Environ. Microbiol*, **66**: 4058-4067.
 21. **García, J. L., Bharat, K., Patel, C., and Ollivier, B.** 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 205-226.
 22. **Godon, J., Zumstein E, Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R.** 1997. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol* **63**: 2802–2813 .
 23. **Hammer Øyvind, Harper D.A.T and Ryan, P.D.** 2006. PAST - PAlaeontological STatistics, ver. 1.53
 24. **Hansen, K. H., Ahring, B. K. and Raskin, L.** 1999. Quantification of syntrophic fatty acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas reactor by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol*, **65**: 4767-4774.
 25. **Hwu, C., Donlon B., and Lettinga, G.** 1996. Comparative toxicity of long-chain fatty acid to anaerobic sludges from various origins. *Water Sci. Technol* **34**: 351–358
 26. **Hwu, C.-S., Tseng, S.-K., Yuan, C.-Y., Kulik Z. and Lettinga, G.** 1998. Biosorption of long-chain fatty acids in UASB treatment process. *Water Res.* **32**(5): 1571–1579.
 27. **Karakashev, D., Batstone D. J., and Angelidaki, I.** 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:331–338.
 28. **Komastu, T., Hanaki, K. and Matsuo,T.** 1991. Prevention of lipid inhibition in anaerobic processes by introducing a two-phase system. *Water Sci. Technol.* **23**: 1189-1200
 29. **Krakat, N., Westphal, A., Schmidt, S. and Scherer, P.** 2010 Anaerobic digestion of renewable biomass: thermophilic temperature governs methanogen population dynamics. *Appl. Environ. Microbiol* **76**(6), 1842–1850.

30. **Kuang, Y. 2002.** Enhancing Anaerobic Degradation of Lipids in Wastewater by Addition of Co-substrate. Thesis
31. **Leclerc, M., Delgènes, J.P, Godon. JJ. 2004.** Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environ Microbiol.* **6**: 809-19.
32. **Liu, W.T., Marsh T.L., Cheng H., and J. Forney L.J. 1997.** Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, **63**: 4516–4522
33. **Mackie, R I. and Bryant M. P. 1981.**Metabolic Activity of Fatty Acid-Oxidizing Bacteria and the Contribution of Acetate, Propionate, Butyrate, and CO₂ to Methanogenesis in Cattle Waste at 40 and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol* **41**: 1363-1373
34. **Marzorati, M., Wittebolle L., Boon, N., Daffonchio, D., and Verstraete, W. 2008.** How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol* **10**: 1571–1581
35. **Masse, L., Kennedy, K.J. and Chou, S.P. 2001.** Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technol* **77**:145–155.
36. **Masse, L., Masse, D.I., Kennedy, K.J. and Chou S.P. 2002.** Neutral fat hydrolysis and long-chain fatty acid oxidation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Biotechnol Bioeng* **79**:43–52.
37. **Masse, L, Masse, D.I. and Kennedy, K.J. 2003** Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochem* **38**:1365–1372.
38. **Mendes, A.A., Ferreira, H.C., Pereira, E.B. and Junior, A.F. 2005.** Aplicacao de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Quim Nova* **28**: 296–305.
39. **Mladenovska, Z., Ishøy, T., Mandiralioglu, A., Westermann, P., and Ahring, B.K. 2001.** Bioaugmentation of a mesophilic biogas reactor by anaerobic xylanolytic and cellulolytic bacteria, in *Proceedings of 9th World Congress on Anaerobic*

Digestion, Part 1, ed. by Van Velsen AFM and Verstraete WH. *Technologisch Instituut vzw, Antwerpen*, pp 183–188.

40. **Mongkolthanaruk, W. and Dharmsthiti, S.** 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Int Biodeter Biodegr* 50:101–105.
41. **Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nubel, U., Santagoeds, C., Schafer, H., and Wawer, C.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbiol. Ecol. Man.* **3.4.4**: 1–27.
42. **Nadaïs, 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. *Water Sci. Technol.* 54 (2), 103e109.
43. **Nelson, M. C.** 2011. An Integrated Investigation of the Microbial Communities Underpinning Biogas Production in Anaerobic Digestion Systems. PhD thesis, The Ohio State University.
44. **O'Sullivan, C.A., Burrell, P.C., Clarke, W.P. and Blackall, L.L.** 2005. Structure of cellulose degrading bacterial community during anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng.* **92**: 871-8.
45. **Pace, N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen.** 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:1–55
46. **Passeggi, M., Lopez, I., and Borzacconi, L.** 2009. Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge. *Water Sci Technol* **59.3**: 501-506.
47. **Pereira, M.A., Pires, O.C., Mota, M. and Alves, M.M.** 2002. Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitic acid as key intermediate. *Water Sci Technol* **45**:139–144.
48. **Pereira, M., Cavaleiro, A., Mota, M. and Alves, 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.
49. **Pereira M., Mota, M., and Alvez, M.** 2004. The important role of mass transfer limitations caused by Long Chain Fatty Acids accumulation onto the anaerobic

sludge. Proceedings of the 10th IWA Congress on Anaerobic Digestion. Montreal, Canada.

50. **Pereira, M., Sousa DZ., Mand, M., and Alves, M.** 2004. Mineralization of LCFA associated to anaerobic sludge: kinetics, transport limitations, enhancement of methanogenic activity and effect of VFA. *Biotechnol Bioeng* **88**:502–510.
51. **Perle, M., Kimchie, S., and Shelef, G.** 1995 Some Biochemical Aspects of the Anaerobic Degradation of Dairy Wastewater. *Water Res.* **29** (6): 1549–1554.
52. **Petruy, R., and Lettinga, G.** 1997. Digestion of a milk-fat emulsion. *Bioresour. Technol.* **61**: 141–149.
53. **Pycke, B. F. G., Etchebehere, C., Van de Caveye P., Negroni, A., Verstraete, W. and Boon, N.** 2011. A time-course analysis of four full-scale anaerobic digesters in relation to the dynamics of change of their microbial communities. *Water Sci Technol.* **63**: 769-775.
54. **Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach J., Li T., Camacho P., and Sghir A.** 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME J.* **3**: 700–714
55. **Rinzema, A., Alphenaar, P.A. and Lettinga, G.** 1993. Anaerobic digestion of long chain fatty acids in UASB-reactors and expanded granular sludge bed reactors. *Process Biochem.* **28**: 527-537
56. **Rollón, AP.** 1999. Anaerobic digestion of fish processing wastewater with special emphasis on hydrolysis of suspended solids. PhD thesis, Sub-department of Environmental Technology, Wageningen Agricultural University.
57. **Satoh, H., Miura, Y., Tsushima, I., and Okabe, S.** 2007. Layered Structure of Bacterial and Archaeal Communities and Their In Situ Activities in Anaerobic Granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7300–7307
58. **Sayed, S.** 1984 Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using a flocculent sludge UASB reactor. *Agric. Wastes* **11**: 197–226.
59. **Sayed, S.** 1987 Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using a granular sludge UASB reactor. *Biol. Wastes* **21**: 11–28.

60. **Schink, B.** 1997. Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**: 262–280
61. **Schmidell, W., Moreira Soares, H., Etchebehere, C., Menes, R. J., Bertola, N. C. and Contreras, E.** 2007. Tratamiento Biológico de águas residuárias. Editora Tribo da Ilha. Florianopolis- SC. Brasil.
62. **Sekiguchi, Y., Kamagata Y., Syutsubo K., Ohashi A., Harada H. and Nakamura K.** 1998. Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16s rRNA gene analysis. *Microbiology* **144**: 2655-2665
63. **Sekiguchi, Y., Kamagata, Y., Nakamura, K., Ohashi A., and 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**: 1280-1288.
64. **Song, H., Clarke, W.P. and Blackall, L.L.** 2005. Concurrent microscopic observations and activity measurements of cellulose hydrolyzing and methanogenic populations during the batch anaerobic digestion of crystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng.* **91**:369-78
65. **Sousa, D.Z.** 2007. Ecology and physiology of anaerobic microbial communities that degrade Long Chain Fatty Acids, PhD Thesis, University of Minho, Portugal
66. **Stachowicz, J.J., Whitlatch, R.B. and Osman, R.W.** 1999. Species diversity and invasion resistance in a marine ecosystem. *Science*, **286**: 1577-1579
67. **Staley, J.T. and Konopka, A.** 1985. Measurement of *in situ* activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, **39**: 321-346
68. **Sun, Y., Zuo J., Chen L., and Wang, Y.** 2008. Eubacteria and Archaea community of simultaneous methanogenesis and denitrification granular sludge. *Journal of Environmental Sciences* **20**: 626–631
69. **Talbot, G., Topp, E., Palina, M.F., and Masse, D.I.** 2008. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water research* **42**: 513 – 537

70. **Travers, D.** 2008. Microbiología aplicada a las ciencias ambientales: reactores biológicos para el tratamiento de efluentes industriales. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias.
71. **Vavilin, V. A., Vailiev, V. B., and Rytov, S.V.** 1996. Simulation of constituent processes of anaerobic degradation of organic matter by the "methane" model. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **69**:15-23.
72. **Verstraete, W., Wittebolle, L., Heylen, K., Vanparys B., Vos, P., Wiele T., and Boon, N.** 2007. Microbial Resource Management: The Road to Go for Environmental Biotechnology. *Eng. Life Sci.*, **7** (2): 117–126
73. **Vissers, E., Bodelier, P., Muyzer, G. and Laanbroek H.J.** 2009 A nested PCR approach for improved recovery of archaeal 16S Rna gene fragments from freshwater samples. *FEMS Microbiol Lett* **298**:193–198
74. **Wang, H., Tolvanen, K., Lehtomaki, A., Puhakka, J. and Rintala, J.** 2010 Microbial community structure in anaerobic co-digestion of grass silage and cow manure in a laboratory continuously stirred tank reactor. *Biodegradation* **21**(1), 135–146.
75. **Wener, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfon, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., Jeffrey J. W., Cummings, T.A., Beers, A.R., Knight, R., and Angenent, L.T.** 2011. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *PNAS* **10**:4158-63.
76. **Wilsey, B.J. and Potvin, C.** 2000. Biodiversity and ecosystem functioning: Importance of species evenness in an old field. *Ecology*, **81**: 887-892.
77. **Wittebolle, L.** 2009. Diversity, stability and functionality of bacterial communities in the nitrogen cycle. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
78. **Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221–271.
79. **Yang, J., Chynoweth P., Williams, D., and Anming, L.** 1990. *Clostridium aldrichii* sp. nov., a Cellulolytic Mesophile Inhabiting a Wood-Fermenting Anaerobic Digester. *International Journal of Systematic Bacteriology* **40**: 268-272.
80. **Zehnder, A. J.** Biology of anaerobic microorganisms. Capitulo 8
81. **Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M. and Keller, M.** 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**:15681-15686.

82. **Zhang, C., Liu, X., and Dong, X.**, 2004. *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 969–973.
83. **Zumstein, E., R. Moletta, and J. J. Godon.** 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* **2**:69–78.

Páginas consultadas:

<http://biobugs.com> [Fecha de consulta: diciembre 2012]

<http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method> [Fecha de consulta: agosto 2012]